



Departamento de Química Física Aplicada

**Thermodynamics, structure and inhibition
of the nucleic acids interaction with
Alzheimer's related A β peptides and Tau protein**

TESIS DOCTORAL

Sergio Camero Gigante

Madrid, 2014

Departamento de Química Física Aplicada
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

**Thermodynamics, structure and inhibition
of the nucleic acids interaction with
Alzheimer's related A β peptides and Tau protein**

Programa de Doctorado en Biofísica de la UAM
Memoria para optar al título de Doctor presentada por:

Sergio Camero Gigante

Licenciado en Bioquímica

Director de tesis

Dr. Juan Salvador Jiménez Martínez

*“Cuando la química física os
parezca sencilla y fácil de entender,
desconfiad, porque lo más probable
es que no hayáis entendido nada”.*

El gran maestro J.J.

Agradecimientos/ Acknowledgements

La presente tesis doctoral es fruto del esfuerzo de varias personas a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

A lo largo de mi carrera académica he tenido la suerte de encontrar profesores buenos, profesores muy buenos, y a Juan Jiménez, que posiblemente sea el máximo responsable de que me haya especializado en el campo de la bioquímica física. Aún recuerdo, al igual que mis compañeros, sus clases épicas en las que aprendimos la importancia de aunar dos mundos a priori tan distintos como la química física y la biología molecular. Le agradezco mucho su apoyo y dedicación constante, que me ha permitido avanzar en el conocimiento de las enfermedades neurodegenerativas con un enfoque multidisciplinar, y todo ello en un ambiente de trabajo agradable y distendido.

Quería agradecer también la ayuda prestada al doctor Jesús Ávila, que ha sido fundamental para que nuestro trabajo se llevara a término, sin olvidarme de los demás miembros de su laboratorio, de Félix, de Raquel y de los compañeros del laboratorio de Francisco Wandosell, que junto con María José me orientaron en la ardua labor de purificar la proteína Tau. Siguiendo con el personal del CBM, no me olvido del grupo del doctor José Antonio Esteban, que dirigió mi proyecto fin de carrera, ni de Maite y Milagros, que nos resolvieron muchas dudas en el servicio de microscopía electrónica.

Agradezco de forma muy especial a la Universidad Autónoma de Madrid la ayuda concedida para completar mi formación durante 3 meses en la Universidad de Missouri-Columbia. It was a pleasure to meet Dr. Renee JiJi, Dr. Jason Cooley and all graduate students from their labs, who were amazingly friendly and made me feel at home. We are deeply thankful to Dr. Aichun Dong for steering us in the right direction in FTIR, and also to Brenntag, the company that kindly donated the gels for our study.

Mención aparte reciben los compañeros y amigos que me han acompañado durante todos estos años en la UAM desde la licenciatura en bioquímica, donde hubo una curiosa simbiosis entre biólogos y químicos, pasando por el máster en biofísica, donde disfruté uno de los mejores años junto a un grupo de encantadores bichos raros, hasta llegar al doctorado, donde Chema, Nacho y Ricardo han hecho aún más llevaderas las horas en el laboratorio. Son muchos los buenos recuerdos que guardo de mi época en Ecocampus, de toda la gente de voley-playa, de los partidos y viajes con el equipo de waterpolo, de las clases de salsa y otras innumerables vivencias. Os estoy muy agradecido a todos aquellos que de un modo u otro me habéis tendido la mano, a los amigos de siempre, a I@s que me quieren y a todos los profesores (también pre-universitarios) que han despertado en mí la pasión por la ciencia.

Quiero acabar dando las gracias a mi familia, y en especial a mis padres, que han hecho tanto por mí a lo largo de estos 26 años. Todo este trabajo va dedicado a vosotros. Sin vuestro apoyo no habría podido iniciar el largo camino que lleva a estas líneas, así que en el fondo, cada palabra de este trabajo es tan mía como vuestra.

INDEX

Abbreviations & Symbols	i
Summary	ii
Resumen	iii
1. Introduction	1
1.1 Alzheimer's disease: a multifactorial neurodegenerative disorder	2
1.2 Possible links among protein-nucleic acid interactions & cell disorders ...	3
1.3 Proteins and peptides involved in Alzheimer's disease	5
1.3.1 Amyloid- β peptides	5
1.3.2 A β_{25-35} : a model of amyloid toxicity	7
1.3.3 Tau protein	8
1.4 Thesis objective	11
2. Materiales y Métodos	13
Materiales	14
Métodos	15
2.1 Resonancia de plasmón superficial	15
2.1.1 Modelo cinético para la unión reversible de Tau a ADN por RPS ...	18
2.1.2 Secuencias de los oligonucleótidos empleados en RPS	20
2.2 Microscopía electrónica de transmisión	21
2.3 Purificación de proteína Tau recombinante en bacterias	21
2.3.1 Transformación de bacterias <i>E.coli</i> por electroporación	21
2.3.2 Cultivo de bacterias a pequeña escala	22
2.3.3 Inducción de la expresión de la proteína Tau por IPTG	22
2.3.4 Lisis bacteriana	23
2.3.5 Eliminación de ácidos nucleicos y proteínas bacterianas	23
2.3.6 Determinación de la concentración y pureza de la proteína Tau ...	24
2.4 Espectroscopía de absorción ultravioleta	27
2.4.1 Ensayos de interacción ADN-proteína	27
2.4.2 Ensayos de fusión del ADN	27
2.5 Espectroscopía de resonancia Raman ultravioleta	29
2.5.1 Preparación de muestras	30
2.5.2 Registro de espectros	30
2.5.3 Procesamiento de espectros	31
2.6 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	32
2.6.1 Adsorción de proteínas en gel	32
2.6.2 Registro de espectros IR	33
2.6.3 Procesamiento de espectros IR y cálculo de estructura	34

3. Resultados	35
3.1 Interacción Tau-ADN	36
3.1.1 Efecto de la fosforilación de Tau en la interacción con ADN	36
3.1.2 Reversibilidad en la unión Tau-ADN. Cálculo de constantes	39
3.1.3 Efecto de la proteína Tau en la fusión de ADN	45
3.1.4 Estudio de Tau y del complejo Tau-ADN por microscopía	49
3.1.5 Interacción de Tau con oligonucleótidos	51
3.2 Interacción A β -ADN	59
3.2.1 Estudio de interacciones entre ADN y péptidos A β por UVRR	59
3.2.2 Interacción de ADN con proteínas y péptidos amiloides por RPS	66
3.2.3 Interacción entre ADN y oligómeros de A β_{1-40} por RPS y UV	73
3.2.4 Interacción ADN-A β_{25-35}	76
3.2.4.1 Determinación de la estructura secundaria de A β_{25-35} por FTIR	78
3.2.4.2 Interacción de A β_{25-35} con oligonucleótidos	83
3.2.4.3 Inhibición de interacciones entre ADN y A β_{25-35} sonificado	86
3.2.4.4 Inhibición de interacciones ADN/histona - A β_{25-35} sonificado	92
4. Discusión	97
4.1 Interacción Tau-ADN: un proceso fisiológico	98
4.1.1 La unión reversible de monómeros de Tau al ADN es funcional	98
4.1.2 La fosforilación de Tau inhibe su unión al ADN <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	99
4.1.3 La hidrofobicidad determina la unión de Tau a otras moléculas	102
4.1.4 Los complejos Tau e histona-ADN tienen propiedades similares	103
4.1.5 El surco menor no es el único elemento del ADN que se une a Tau	104
4.2 Interacción A β -ADN: una anomalía en el núcleo celular	106
4.2.1 Los oligómeros y agregados de A β_{25-35} y A β_{1-40} interaccionan con ADN, a diferencia de otros agregados de origen proteínico	106
4.2.2 La interacción del péptido A β_{25-35} con secuencias cortas de ADN es inhibida parcialmente por moléculas con estructura análoga a la de las bases del ADN	108
5. Conclusiones	113
6. Conclusions	117
7. Bibliography	121
Published articles during PhD period	143

Abbreviations & Symbols

aa	aminoacids
A β	amyloid-beta
AD	Alzheimer's disease
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFM	atomic force microscopy
AMP	adenosine 5'-monophosphate
APPHSE	amyloid precursor protein heat shock element
APS	ammonium persulfate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
bp	base pair(s)
BSA	bovine serum albumin
Ds-DNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
Δ	change in
ϵ	molar extinction coefficient
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EM	electron microscope
FTIR	Fourier transform infrared
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 beta
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl-thiogalactopyranoside
IR	infrarrojo
λ	wavelength
LB	lysogeny broth
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14
oligo	oligonucleótido
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pb	par(es) de bases
pI	punto isoeléctrico
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RPS	resonancia de plasmón superficial
RB	running buffer
RT	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPR	surface plasmon resonance
Ss-DNA	single-stranded deoxyribonucleic acid
τ	Tau protein
TAE	Tris-acetate-EDTA (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
T _m	melting temperature
TP53	tumor protein p53
UV	ultraviolet
UVR	ultraviolet Raman resonance
w/v	weight per volume

Summary

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder triggered by still unknown causes, appearing most of times in elderly patients in a spontaneous manner. Senile plaques, extraneuronal deposits with a high percentage of aggregated A β peptides, and intraneuronal tangles, mainly composed of Tau protein, are the main hallmarks of this multifactorial disease. The amyloid hypothesis, which claims that abnormal processing of A β peptides is the key factor triggering the cascade of fatal events leading to disease, has gained great attention and a huge effort has been made to eliminate senile plaques, which however have yielded disappointing results. Over the last years we have witnessed a change of paradigm as a result of new evidences that proved a previous toxicity exerted by oligomers of A β peptides. This fact is added to the intriguing reported location of amyloid peptides and Tau protein within the neuronal nucleus, that might somehow, be involved in the first stages of the disease.

Our study is focused on the molecular bases of Alzheimer's disease through the interactions that DNA establishes with the main proteins involved in AD: A β peptides and Tau protein. By means of SPR assays we proved that Tau binds to DNA in a reversible manner, forming a stable complex through hydrophobic interactions. According to our results, this complex cannot be formed when Tau protein is massively phosphorylated. In addition, we determined the binding sites of DNA to Tau protein, which are not restricted to the minor groove of the DNA double helix and might also encompass other zones as the phosphate groups. We observed that Tau provides DNA with structural and thermodynamic properties which are similar to those conferred by histone, what added to other authors' results *in vivo* invite to conclude that Tau protein exerts a functional role in the neuronal nucleus. On the other hand, our results confirm that as much highly aggregated amyloid species as smaller A β_{25-35} and A β_{1-40} oligomers interact with DNA *in vitro*, in contrast to other non-proteinaceous aggregates excepting histones, even though no functional roles have been found for these A β -DNA interactions in the neuronal nucleus. By means of FTIR spectroscopy we characterized the secondary structure of A β_{25-35} aggregates, obtaining a high percentage of β -structures which might mediate A β -DNA interaction. Molecules like probenecid and tetracycline partially inhibited such interaction and have also shown to reduce the A β -mediated neurotoxicity in animal models. Thus, we conclude that A β -DNA interaction is toxic and that its inhibition might be a therapeutic target in future AD treatments.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo originado por causas aún desconocidas y que en la mayoría de los casos aparece espontáneamente en pacientes de avanzada edad. Las placas seniles, depositadas alrededor de las neuronas con un alto porcentaje de péptidos β -amiloides agregados, y los ovillos intraneuronales, compuestos por fibras de proteína Tau, son característicos de esta enfermedad multifactorial. La hipótesis amiloide, que señala al procesamiento anómalo de los péptidos β -amiloides como uno de los desencadenantes moleculares de la enfermedad, ha ganado fuerza y se ha invertido un gran esfuerzo en la eliminación de las placas seniles que sin embargo, no ha dado los resultados esperados. Durante los últimos años hemos presenciado un cambio de paradigma y son muchos los grupos que han demostrado una toxicidad previa ejercida por oligómeros de amiloide. Este hecho se une a la intrigante localización de péptidos amiloides y Tau en el núcleo neuronal, que podría contribuir al inicio de la enfermedad.

Nuestro estudio se centra en las bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer a través de las interacciones que establece el ADN con los péptidos $A\beta$ y la proteína Tau. Mediante RPS comprobamos que Tau se asocia reversiblemente al ADN, formando un complejo estable a través de interacciones hidrofóbicas. El complejo no pudo formarse con proteína Tau masivamente fosforilada. Además determinamos los sitios de unión del ADN a Tau, que no se limitan únicamente al surco menor de la doble hélice y podrían abarcar otras zonas menos específicas como los grupos fosfato. Observamos que Tau confiere al ADN propiedades estructurales y termodinámicas similares a las que le confiere la histona, lo que sumado a estudios *in vivo* de otros autores nos permite concluir que Tau ejerce un papel funcional en el núcleo neuronal. Por otra parte, nuestros resultados confirman que tanto especies altamente agregadas como oligómeros de $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{1-40}$ interaccionan con ADN *in vitro*, a diferencia de otros agregados no proteínicos exceptuando a la histona, aunque no se ha encontrado ningún papel funcional para la interacción $A\beta$ -ADN hasta la fecha. Mediante espectroscopía FTIR caracterizamos la estructura secundaria de agregados de $A\beta_{25-35}$, obteniendo un elevado porcentaje de estructuras tipo β que podrían mediar la interacción $A\beta$ -ADN. Moléculas como probenecid y tetraciclina inhiben parcialmente dicha interacción y además han demostrado disminuir la neurotoxicidad mediada por $A\beta$ en otros modelos animales. Por ello, concluimos que la interacción $A\beta$ -ADN es tóxica y que su inhibición podría ser terapéutica en futuros tratamientos de Alzheimer.

1

Introduction

1.1 Alzheimer's disease: a multifactorial neurodegenerative disorder

More than a century ago, the German psychiatrist Alois Alzheimer reported the first case of a complex dementia characterized by increasing memory loss, disorientation, changes of behavior and a decline of cognitive functions leading to death. This kind of dementia was named after the mentioned psychiatrist and nowadays represents the most common age-related neurodegenerative disorder (Selkoe, 2001). Moreover, the proportion of world population affected by AD is expected to grow exponentially paralleling the increase in life expectancy in most of countries. Only a small percentage of cases show an early onset (before the age of 60) as a result of autosomal dominant inheritance. This type, known as familial Alzheimer's disease (FAD), is directly related to genetic mutations in some of the next genes: APP (amyloid precursor protein) in chromosome 21 (Goate et al., 1991), PSEN1 (Presenilin 1) in chromosome 14 (Sherrington et al., 1995) and PSEN2 (Presenilin 2) in chromosome 1 (Levy-Lahad et al., 1995). Whereas early-onset FAD represents about 5% of cases (Bekris et al., 2010), sporadic late-onset AD is the most frequent form. Nevertheless, the apolipoprotein E type 4 allele (*APOE*ε4) has been linked to late-onset familial and sporadic AD too, so that individuals with 2 copies of this allele have a higher risk of developing AD (Corder et al., 1993; Farrer et al., 1997). In contrast to other isoforms like apoE2 and apoE3, which deliver cholesterol to sites of injury for cell repair, apolipoprotein E4 has shown to be detrimental in neurons (Mahley et al., 2006).

Multiple factors have been proposed to contribute to sporadic Alzheimer's. Mitochondrial dysfunctions are closely related to oxidative stress in the aging process. Mitochondria play an important role in maintaining energy balance in the brain, but at the same time, produce a high amount of reactive oxygen species (ROS) that activate apoptosis pathways (Lin et al., 2006; Moreira et al., 2010). However, other authors claim herpes simplex virus type I is the main trigger of AD, inducing accumulation of Aβ peptides and tau protein phosphorylation (Wozniack et al., 2007; 2009; Santana et al., 2012). There are some evidences that link air pollution to alterations in Aβ and Tau (Calderón-Garcidueñas et al., 2012) and recent reports have proved that bacteria and fungi are present in brains of AD patients (Soscia et al., 2010; Alonso et al., 2014).

All of these novel findings pointing at exogenous agents as the first triggers of Alzheimer's (reviewed in Mawanda et al., 2013) may have an element in common, since recent publications attribute an antimicrobial and antiviral role to A β peptides in human brains (Soscia et al., 2010; Lukiw et al., 2010). According to their results, the amyloid-beta peptides might form part of the innate immune system and would be produced to face a variety of environmental stressors. Indeed, AD has been recently labeled as a neuroinflammatory process and it is well-known that microglia and astrocytes, immune cells which response to systemic infections, are activated during AD (Rivest, 2009; Cameron et al., 2010). Therefore, it is tempting to think that neurotoxic effects of A β might be collateral damages derived from an immune reaction.

1.2 Possible links among protein-nucleic acid interactions & cell disorders

Over the past 20th century, hundreds of peptides with antimicrobial properties have been found in insects, animals and humans (Brogden, 2005). Its mechanisms of action span membrane pores formation (Henzler et al., 2003), inhibition of bacteria replication (Subbalakshmi et al., 1998) or even inhibition of DNA repair (Su et al., 2010). Remarkably, some peptides are able to bind nucleic acids in order to disturb essential functions, leading to death. Buforin II, a peptide discovered in the stomach tissue of the Asian toad *Bufo bufo gargarizans*, crosses bacterial membranes and binds to *E.coli* DNA and RNA inducing deleterious effects that finally kill these bacteria (Park et al., 1998). In other organisms like mammals, the cathelicidin family of host peptides plays a key role in the immune defense against viruses. Indolicidin is a bovine cathelicidin which can inhibit the HIV-1 infection by forming a covalent bond with DNA, avoiding the integrase-DNA complex formation (Marchand et al., 2006).

Although these peptide-DNA interactions have not been described in human brains yet, A β -DNA interaction has been confirmed *in vitro* (Hegde et al., 2004; Barrantes et al., 2007), and even a DNA nicking activity has been attributed to A β ₁₋₄₂ peptide (Suram et al., 2007). Moreover, Ohyagi's group demonstrated that A β ₁₋₄₂ can stimulate p53-dependent apoptosis in neurons (Ohyagi et al., 2005) and other authors

had previously shown nuclear localization of A β peptides in HEK and CHO cells (Johnstone et al., 1996; Bückig et al., 2002). The detailed mechanisms by which these peptides exert toxicity remain unclear, but it seems feasible that small A β forms could diffuse accidentally into the nucleus of human cells inducing unpredictable changes in DNA and gene expression. In addition, proteomic and genetic studies revealed that defects in RNA metabolism due to RNA-binding proteins (RBPs) dysfunctions are involved in several neurological disorders (Lukong et al., 2008) and thus, the already reported A β -RNA interactions (Ginsberg et al., 1997; 1998; 1999) could also contribute significantly to detrimental neuronal impairments.

Indeed, a number of proteins involved in neurodegenerative diseases have been localized in the neuronal nucleus and have also shown DNA/RNA binding capacity (reviewed in Jiménez, 2010). First of these interactions was reported *in vitro* with prion proteins, which are related to transmissible spongiform encephalopathies (Nandi et al., 1997). A later report correlated non-specific prion-DNA complexes *in vivo* with a reduction in N2a cell viability (Macedo et al., 2012) and other authors have suggested that prion-RNA interactions are also required to form toxic protease-resistant prion aggregates (Deleault et al., 2003; Silva et al., 2008). In fact, mechanisms of nucleic acid-mediated protein aggregation have been proposed (Liu et al., 2011). For instance, DNA can act as a template for accelerating the aggregation of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1), a dimeric enzyme implicated in amyotrophic lateral sclerosis development (Jiang et al., 2007). This catalytic effect of DNA has been found in Parkinson's disease as well. In this case, DNA may act as a nucleation catalyst that facilitates assembly of α -synuclein into fibrils (Cherny et al., 2004). Eventually, it is clear that a large group of proteins involved in polyglutamine diseases can bind DNA in neuronal nucleus (Kegel et al., 2002; Vismara et al., 2009).

Throughout the present thesis we have focused on the potential non-specific A β -DNA interactions that might take place in AD and have tested a number of molecules as possible inhibitors of these interactions. Probenecid (Carrillo-Mora et al. 2010) and tetracycline (Diomedea et al., 2010) are two of the selected molecules that have recently shown therapeutic effects *in vivo* reducing amyloid- β induced toxicity.

1.3 Proteins and peptides involved in Alzheimer's disease

1.3.1 Amyloid- β peptides

A β is a 38-43 amino acid peptide derived from the proteolytic processing of APP (amyloid- β precursor protein). The transmembrane polypeptide APP may undergo 2 routes (Figure 1.1): the non-amyloidogenic pathway, mediated by α -secretase, or the amyloidogenic pathway, which involves a cleavage by β -secretase (Chow et al., 2010). Presenilins 1 and 2 form part of a large proteinase complex that controls the final γ -secretase cleavage in both pathways. It was assumed for a long time that A β production was an abnormal event, but experiments with A β antibodies in the early '90s revealed that these peptides are constitutively secreted in normal conditions (Haas et al., 1992; Busciglio et al., 1993). Indeed, they have been detected in both cerebrospinal fluid (CSF) and plasma of healthy patients (Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992).

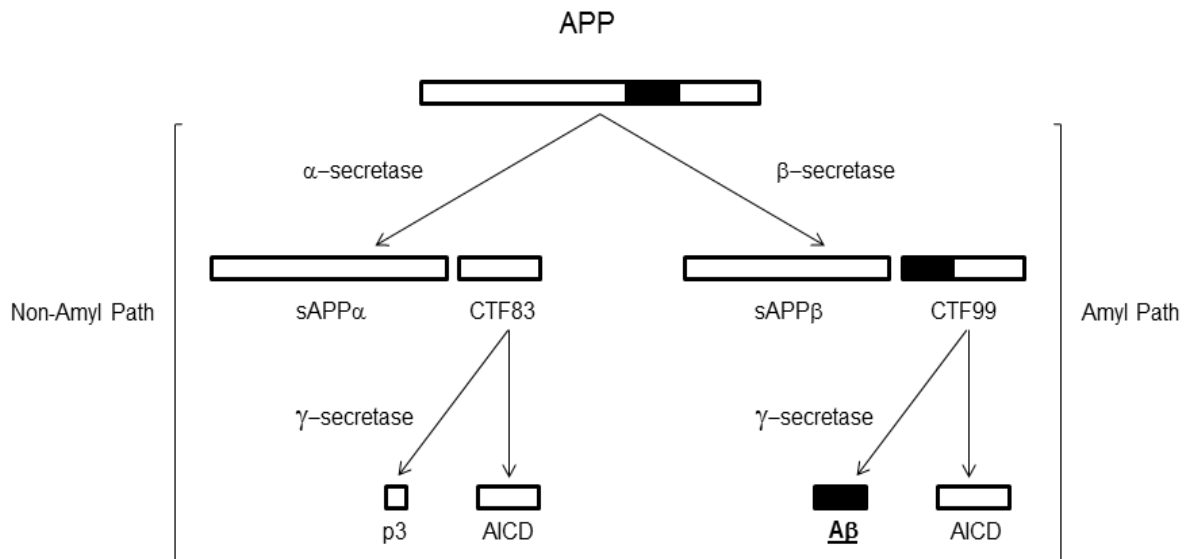


Figure 1.1: APP processing paths. The non-amyloidogenic pathway (left) includes cleavages by α - and γ -secretase leading to the secretion of a long N-terminal ectodomain termed secreted APP α (sAPP α) and C-terminal fragments (CTF) like CTF83, p3 and AICD (APP intracellular domain). In contrast, the amyloidogenic processing pathway involves cleavage by β -secretase which produces sAPP β and CTF99. Subsequent processing of CTF99 by γ -secretase results in the generation of AICD and A $\beta_{1-40/42}$ peptides.

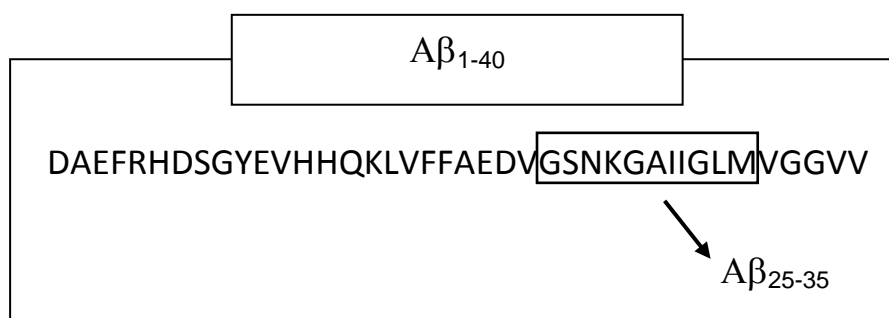


Figure 1.2: Amino acids sequence of two Aβ peptides used in the present thesis: Aβ₁₋₄₀ and Aβ₂₅₋₃₅

Up to 10 amyloid-β peptides species have been detected in CSF of both patients with AD and healthy controls by means of mass spectroscopy (Maddalena, 2004). Nevertheless, Aβ₁₋₄₀ peptide (Figure 1.2) is the most abundant form, followed by Aβ₁₋₄₂, which accounts for a 10% of total Aβ population. Interestingly, despite the low proportion of Aβ₁₋₄₂ in CSF, it is the main component of senile plaques together with Aβ₁₋₄₀ (Gravina et al., 1995). Aβ₁₋₄₂ aggregation process in the brain reduces its level in CSF and thus, the Aβ₁₋₄₂/Aβ₁₋₄₀ ratio has been proposed as a possible Alzheimer's diagnostic (Spies et al., 2010). Total concentration of Aβ in non-AD brains may be around 2 μg/g whereas in Alzheimer's disease the amyloid concentration can broadly exceed 30 μg/g (Cherny et al. 1999; Rauk et al. 2008). According to the amyloid hypothesis, accumulation and aggregation of Aβ in the brain is thought to be a central event in the pathogenesis of Alzheimer's (Hardy et al., 2002), but neither the causes nor the molecular mechanisms behind the accumulation of Aβ in sporadic AD are clear.

Research on 2 specific Aβ peptides is described in this thesis: Aβ₁₋₄₀ and Aβ₂₅₋₃₅. Aβ₁₋₄₀ and Aβ₁₋₄₂ display identical amino acids sequences except for two additional hydrophobic residues present at the end of Aβ₁₋₄₂: Isoleucine and Alanine. Surprisingly, this small change seems to be crucial in the assembly process, since Aβ₁₋₄₂ and Aβ₁₋₄₀ oligomerize though distinct processes (Bitan et al., 2003). Aβ₁₋₄₀ aggregation process is significantly slower and therefore it offers a wider variety of possibilities. DNA-Aβ₁₋₄₂ studies were performed in previous contributions from our lab (Barrantes et al., 2007).

1.3.2 A β_{25-35} : a model of amyloid toxicity

In 1990, a pioneer work concluded that A β_{25-35} represents the minimal portion of the full peptide that causes toxic effects in neurons (Yankner et al., 1990). Further studies found that both, formation of stable aggregates and induction of neurotoxicity are observed in A β peptides containing the 29-35 central amino acids (Pike et al., 1993). Because of its extraordinary capacity to induce memory impairments in mouse models (Clementi et al., 2005; Huang et al., 2010) A β_{25-35} has become a recurrent tool in AD research. Some authors claim that A β_{25-35} peptide cannot be synthesized *in vivo* through APP processing, but recent data support an alternative production pathway. Kaneko's group proved that racemization of amino acids (from L to D form) in A β is a typical age-dependent process, and that A β_{1-40} racemized at Ser²⁶ is easily converted by brain proteases to truncated toxic fragments [D-Ser²⁶]A β_{25-35} and [D-Ser²⁶]A β_{25-40} (Kaneko et al., 2001; Kubo et al., 2002; 2003). In addition, other authors have obtained increased titers of antibodies specific for A β_{25-35} oligomers in patients with mild to moderate AD (Gruden et al., 2007), conferring physiological relevance on this peptide.

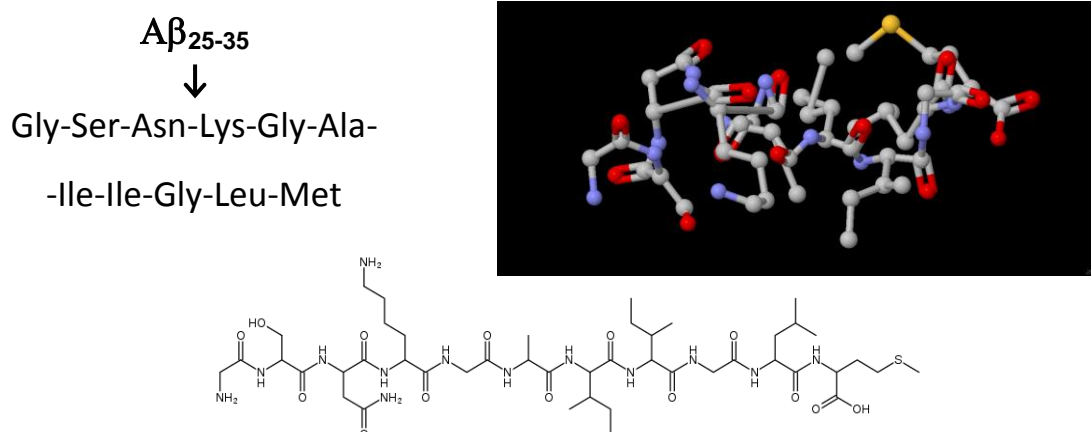


Figure 1.3: Amino acids sequence, 2-D and 3-D structure of A β_{25-35} peptide.

A β_{25-35} (Figure 1.3) displays a high tendency to become aggregated, but its aggregation process is sequence-dependent, since it is well-known that a scrambled form cannot assemble into any kind of aggregates *in vitro* (Barrantes et al., 2012).

1.3.3 Tau protein

Tau was discovered in 1975 by Kirschner's group (Weingarten et al., 1975). This protein is included in a heat stable family of microtubule-associated proteins (MAPS) whose main function is to promote the assembly of tubulin into microtubules and stabilize their structure. Microtubules are tubulin polymers of the cytoskeleton, which are essential for cell viability due to their important role in mitosis and intracellular transport of vesicles and organelles. There are six major isoforms of Tau expressed in the adult human brain which are derived from a single gene by alternative splicing. Their proportion changes during development, being the smallest isoform the one expressed during the postnatal stage (Kosik et al., 1989; Goedert et al., 1989). Isoforms differ in the presence or absence of two inserts coded by exons 2 and 3, as well as the domain R2. The longest human isoform (hTau42) contains 4 repeats (R1-R4) and two inserts (Figure 1.4) and was used in the interaction assays of this thesis.

Tau protein is distributed throughout the nervous system, mainly in the axons of neurons (Binder et al., 1985). In addition, Tau has been found as well in the neuronal nucleus (Loomis et al., 1990; Sultan et al., 2011) although its function in this compartment remains to be understood. It has been hypothesized that phosphorylation regulates nucleocytoplasmic Tau shuttling under stress conditions (Sultan et al., 2011) similarly to nuclear translocation of some transcription factors (Hao et al., 2013).

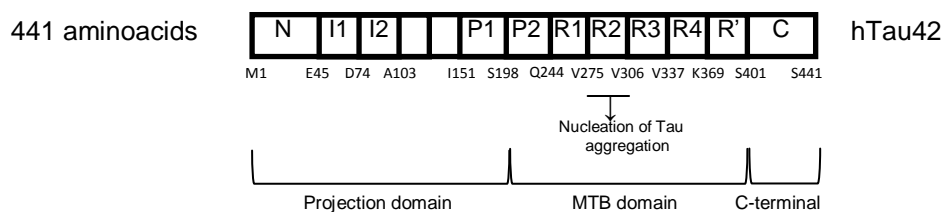


Figure 1.4: Domain organization of human Tau protein hTau42. Tau structure is divided into 2 principal domains: Projection domain, in the amino-terminal region (N) and Microtubule binding domain (MTB), near the carboxy-terminal (C). N-terminal projects out from the microtubule surface together with two inserts (I1, I2) which are absent in hTau23 and hTau24, and the flanking proline-rich flanking region P1. On the other side, R1-R4 represent the repeat domain, which together with P2 and R' flanking regions form the MTB domain. At the beginning of R2 and R3 repeats several motives promote Tau aggregation.

Indeed, phosphorylation is the most studied post-translational modification of Tau and its role as a regulator of Tau functions is well-known. For instance, it was reported that phosphorylation diminishes the affinity of Tau for the microtubule lattice (Drechsel et al., 1992; Illenberger et al., 1998) and more recently, that it might play a role in synaptic function, where Tau may influence neuronal communication (Pooler et al., 2014). Tau is phosphorylated by multiple kinases including proline-directed kinases like cyclin-dependant kinase 5 (CDK5) (Baumann et al., 1993) and mitogen activated kinase (MAPK) (Drewes et al., 1992; Lu et al., 1993) both with a moderate effect on Tau-microtubules interactions. In contrast, non-proline-directed kinases like protein kinase A (PKA) and microtubule affinity regulating kinase (MARK) may inhibit Tau-microtubule binding by phosphorylating specific sites (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1997; Illenberger et al., 1998). Src family kinases (SFK) such as fyn targets specifically tyrosine residues (Lee et al., 1998) whereas casein kinase 1 and 2 (CK1 δ , CK2) are able to phosphorylate Tau at numerous sites (Hanger et al., 2007). Finally, GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 beta) has been the subject of much research given that it might be a link between the main characters of AD: amyloid- β peptides and tau protein (Noble et al., 2005; Ávila, 2006; Álvarez et al., 2007; Jope et al., 2007).

On the other hand, Tau protein is dephosphorylated by several phosphatases like PP1, PP2, PP2A, PP2B and PP5 (Tian et al., 2002; Gong et al., 2004; Liu et al., 2009). PP2A plays a predominant role in human brain together with PP1, accounting for approximately 71% and 11%, respectively, of the total Tau phosphatase activity (Liu et al., 2005). The regulation of PP2A is extremely complicated and it seems to be affected by A β overproduction, which induces its inactivation in Alzheimer's disease (Zhou et al., 2008). In fact, not only PP2A activity is decreased in Alzheimer's since low levels of PP1 and PP5 have been found in human AD brains (Gong et al., 1993; Gong et al., 1995; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001; Liu et al., 2005).

The complex equilibrium that controls the phosphorylation state of Tau may fail at some point for reasons yet to be explained, leading to Tau hyperphosphorylation. This anomalous process changes the non-defined monomeric conformation of Tau protein and might be related to its conversion in highly aggregated structures named

PHFs (paired helical filaments), which are one of the hallmarks of Alzheimer's disease and other tauopathies. Several experiments (Alonso et al., 2001; Jeganathan et al., 2008) suggested that hyperphosphorylation act like a nucleation factor promoting aggregation of Tau protein. In addition, it was also confirmed that hyperphosphorylated Tau in Alzheimer's disease brains is able to sequester normal Tau and other MAPS into tangles (Alonso et al. 1994; 1996; 1997) disassembling microtubules. Nevertheless, there are some evidences of neuronal damage in absence of PHFs, suggesting that there must be earlier toxic events which trigger microgliosis and neuroinflammation, prior to tangles formation (Yoshiyama et al., 2007).

Novel findings have described a new mechanism by which abnormally folded forms of Tau could induce changes in neighbouring neurons (reviewed in Holmes et al., 2012). This process, known as trans-cellular propagation, was firstly found in prions, but has been recently extended to other molecules involved in neurodegenerative disorders such as α -synuclein and A β peptides (Holmes et al., 2012; Nussbaum et al., 2013). In this context, PHFs might be only the tip of the iceberg and therefore, new approaches should be applied in order to tackle the earliest stages of Alzheimer's.

More than 30 molecules have been found to be Tau-binding partners, including nucleic acids (Mandelkow et al., 2012) but there is still little information available about Tau-DNA interactions. A protective role has been proposed for this interaction (Sultan et al., 2011) although its nature and features have not been characterized yet. Aiming to shed new light on the role of Tau in the cell nucleus, we carried out a detailed study of Tau-DNA interaction by means of surface plasmon resonance, UV spectroscopy and electron microscopy. It was formerly developed in our lab a SPR set-up that enables the immobilization of proteins or nucleic acids and a real-time detection of interactions taking place at the sensor surface. In fact, a previous contribution from our lab already proved the interaction of Tau with the amyloid- β peptide (25-35) by means of SPR and suggested that A β ₂₅₋₃₅ induces Tau protein polymerization (Pérez et al., 2004). Thus, it is crucial determining which forms of Tau bind to DNA in a functional manner, given that A β -induced Tau aggregation might impair Tau protein's protective function in the neuronal nucleus.

1.4 THESIS OBJECTIVE

Within the framework of the molecular bases that underlie Alzheimer's disease, the present thesis focuses on DNA interactions with A β peptides and Tau protein. Whereas the Tau-DNA interaction has been hypothesized to be protective, some studies have associated the presence of A β peptides in the neuronal nucleus with some of the earliest neurotoxicity processes. For this reason, the inhibition of A β -DNA interaction is addressed in this work as a possible pathway to prevent the origin of Alzheimer's.

The specific goals of this thesis may be summarized as follows:

1. Understanding the effect of phosphorylation and aggregation on Tau-DNA binding.
2. Gaining an extensive comprehension of the thermodynamic and structural factors that determine the reported Tau-DNA interaction.
3. Studying the binding of DNA to different forms of A β peptides and identifying the secondary structure that underlies the amyloid aggregates.
4. Analyzing the specificity of the DNA interaction with A β peptides by comparing the binding with other proteinaceous aggregates.
5. Testing *in vitro*, as potential inhibitors of the A β -DNA interaction, several molecules that have shown to reduce the A β -induced neurotoxicity *in vivo*.

2

Materiales y Métodos

MATERIALES

A continuación se citan los reactivos utilizados a lo largo de esta tesis y las casas comerciales donde fueron adquiridos:

Proteínas, polipéptidos y aminoácidos: Albúmina de suero bovino (A7906), β -lactoglobulina de leche bovina (L3908), caseína de leche bovina (C5890), histona completa de timo de ternera tipo II-A (H9250), histona H1 de timo de ternera tipo III-S (H5505), mioglobina de músculo esquelético equino (M0630) y poli-L-lisina hidrocloreto de peso molecular 15000-30000 g/mol (P2658) se compraron a Sigma (St. Louis, MO, USA). Los péptidos $A\beta_{25-35}$ (SC489) y $A\beta_{1-40}$ (SC875) se compraron a PolyPeptide (Strasbourg, France) y se disolvieron siguiendo las recomendaciones del fabricante. El aminoácido glicina se compró a Bio-Rad (CA, USA).

Ácidos nucleicos y nucleótidos: ADN de doble hebra de timo de ternera tipo XV, activado con ADNasa I (D4522), oligonucleótidos, poly A (ácido poliadenílico, P9403), poly U (ácido poliuridílico, P9528) y ATP (sal hidratada de sodio, A26209) se compraron a Sigma (St. Louis, MO, USA). AMP (sal disódica) a MERCK (NJ, USA).

Otros reactivos: Alhydro-Gel 2% y Adju-Phos 2% fueron gentilmente donados por Brenntag (Denmark). Acetato de uranilo fue suministrado por el servicio de microscopía electrónica del CBM (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM). Distamicina A hidrocloreto se compró a SINUS Biochemistry & Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). EDTA, etanol, metanol y ácido acético a PANREAC (Barcelona, Spain). HEPES (H3375), heparina porcina de bajo peso molecular (H8537), Probenecid (P8761), Tetraciclina (87128) y Trizma base (T1503) a Sigma (St. Louis, USA). Acrilamida/Bisacrilamida, agar, β -mercaptoetanol, persulfato amónico, SDS, TEMED y Coomassie Brilliant Blue a Bio-Rad (CA, USA). SYBR Green, a Invitrogen (CA, USA). Cloruro e hidróxido sódico se compraron a MERCK (NJ, USA).

El agua en que disolvemos todos los reactivos es agua estéril bidestilada, purificada en nuestro laboratorio con un destilador propio. Salvo en los casos en los que se especifique lo contrario, los experimentos se realizaron en un tampón compuesto por HEPES 10 mM y NaCl 100 mM ajustado a pH 7.

MÉTODOS

2.1 Resonancia de Plasmón Superficial

Esta técnica monitoriza las interacciones macromoleculares que tienen lugar en la interfase entre dos medios con distinto índice de refracción: un medio acuoso y un sólido metálico, que en nuestro caso es el oro. El equipo (Figura 2.1), de diseño propio, consta de una pequeña célula de flujo en contacto con una lámina de vidrio recubierta por una capa de oro, un prisma semicircular que presiona la lámina contra la célula, y un láser monocromático de Helio-Neón ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) que emite radiación polarizada en el plano sobre la interfase entre el oro y el medio externo, que fluye a través de la célula impulsado por una bomba peristáltica (LKB, Microperpex). La intensidad de luz reflejada es registrada por un fotodiodo y convertida en valores de reflectancia mediante un programa de ordenador desarrollado en nuestro laboratorio. Un plasmón superficial o polaritón es una onda electromagnética superficial que se propaga a lo largo de la interfase entre un metal y un dieléctrico, asociada a oscilaciones de grupos de electrones en la proximidad de la superficie del metal.

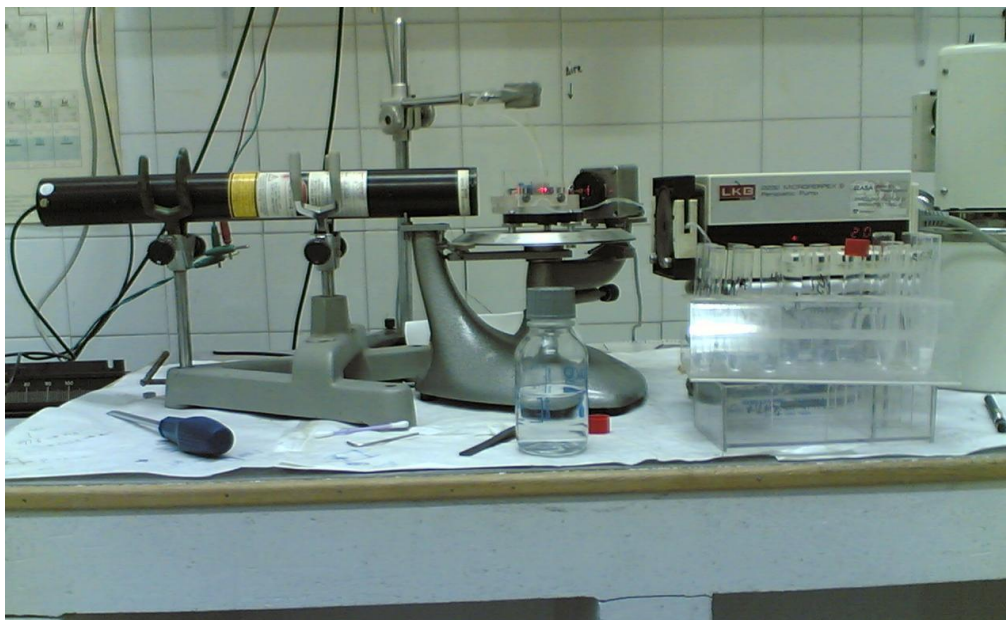


Figura 2.1: Nuestro equipo de resonancia de plasmón superficial. En la parte izquierda se encuentra el láser, que irradia luz monocromática sobre la célula del sensor (parte central). La bomba peristáltica (derecha) suministra la muestra en disolución, que circula a flujo constante sobre la lámina de oro.

La resonancia de plasmón superficial es la excitación resonante de estas ondas superficiales mediante radiación. La excitación se consigue trabajando en condiciones de reflexión total, por encima del ángulo crítico, para generar una onda evanescente que se propaga a lo largo de la interfase metal-dieléctrico. Puesto que la longitud de esta onda evanescente depende del ángulo de incidencia, existe un ángulo para el que la longitud de la onda satisface la relación de dispersión para los plasmones superficiales. En estas condiciones se produce la resonancia, que implica la absorción de energía de la radiación del láser por medio de la onda evanescente.

Al registrar la luz reflejada en función del ángulo de incidencia se obtienen las curvas de resonancia (Figura 2.2, parte C) que muestran un mínimo, donde la absorción de la radiación es máxima, conocido como ángulo de resonancia. Este ángulo es muy sensible a cambios en el índice de refracción que tienen lugar en la interfase. El índice de refracción depende a su vez del espesor y la naturaleza de las moléculas adsorbidas en la interfase. Por tanto, trabajando a un ángulo fijo a la izquierda del ángulo de resonancia, los cambios de espesor en la superficie del sensor conducen a aumentos de reflectancia en función del tiempo (Figura 2.2., parte D), lo que permite monitorizar interacciones macromoleculares en superficie.

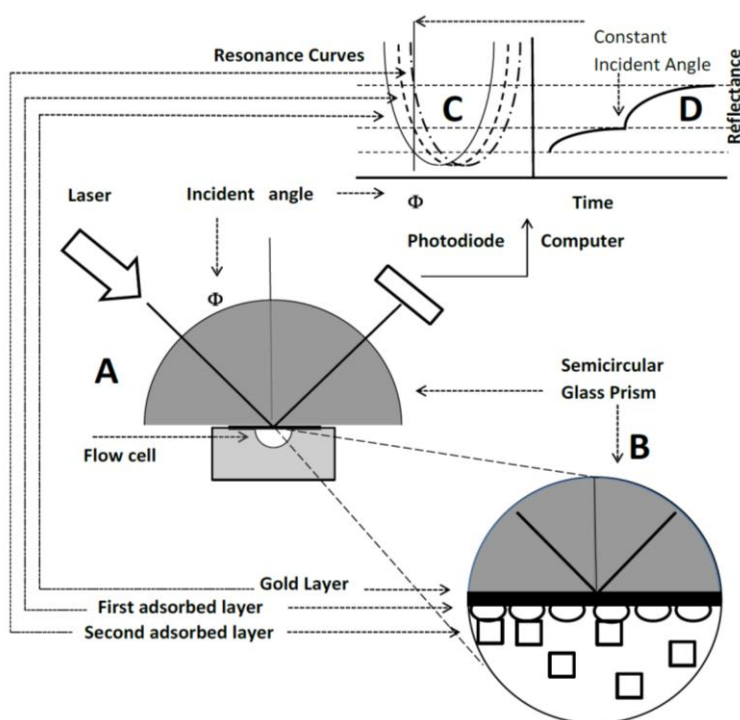


Figura 2.2: Esquema de RPS

A: Recorrido de la radiación del láser a través del sensor. **B:** Ampliación de la interfase de la lámina de oro y el medio en flujo. **C:** Curvas de resonancia del oro (1^a), de una primera monocapa de moléculas y de una segunda que interacciona con la anterior. **D:** Gráfica de reflectancia frente al tiempo de flujo, para un valor fijo del ángulo de incidencia (ϕ).

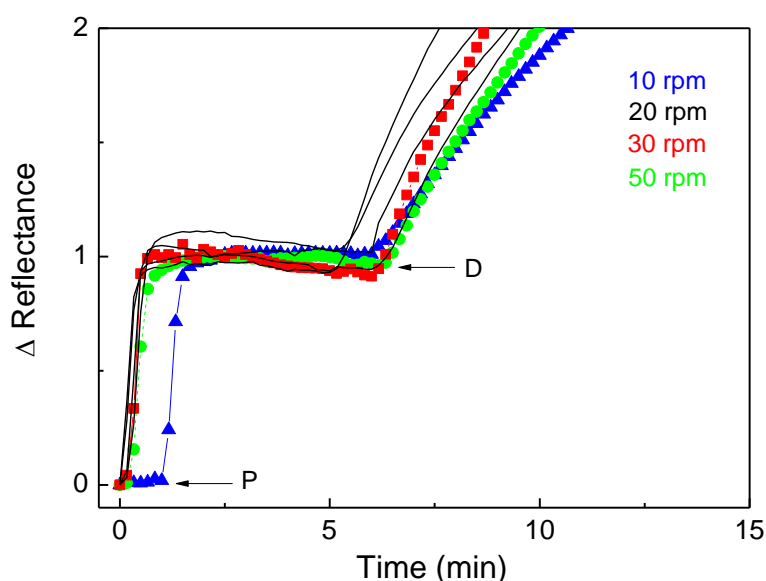


Figura 2.3: La velocidad de unión a la superficie del sensor es independiente de la velocidad de flujo. Las curvas de unión de ADN (D) a la superficie del sensor activada por polilisina (P) se inyectaron a diferentes velocidades de la bomba: 10, 20, 30 o 50 revoluciones por minuto. Todos los ensayos de RPS mostrados en la figura se realizaron a la misma concentración de polilisina (40 $\mu\text{g/mL}$) y ADN (8 $\mu\text{g/mL}$).

La Figura 2.3 muestra varios ensayos en los que se inmoviliza la doble hélice de ADN en la superficie del sensor a distintas velocidades de flujo. Se aprecia que las curvas de unión presentan similares velocidades iniciales de unión. Las diferencias entre ensayos a distintas velocidades no se ajustan a un patrón definido por las revoluciones de la bomba. Por tanto, no es posible establecer una relación entre velocidad de flujo de la muestra y velocidad de unión a la superficie. Ésta sólo depende de la naturaleza de la superficie (las características de la lámina) y de la concentración de la muestra, según el mecanismo detallado en la sección siguiente.

Para evitar que las moléculas se desnaturalicen al entrar en contacto directo con la superficie de oro, construimos una estructura triple de polilisina-heparina-polilisina sobre la que unimos ADN. La superficie puede regenerarse fácilmente cambiando el pH neutro a pH básico con NaOH (Benítez et al., 2002). Las láminas de oro utilizadas en esta tesis, de 50 nm de espesor, fueron preparadas en la Universidad Autónoma de Madrid o bien adquiridas de Xantec Bioanalytics (Dusseldorf, Germany).

2.1.1 Modelo cinético para la unión reversible de Tau a ADN medida por RPS

El mecanismo más simple que describe la interacción reversible de la proteína Tau con ADN inmovilizado en la superficie (ADN_i) activada por polilisina-heparina-polilisina (PHP), para formar el complejo ADN-Tau, viene dado por el equilibrio:



La ecuación diferencial que define el equilibrio reversible en ambos sentidos es:

$$v \equiv d \Gamma(ADN_i - \text{Tau}) / dt = k_1 \Gamma(ADN_i) [\text{Tau}] - k_{-1} \Gamma(ADN_i - \text{Tau}) \quad (2.2)$$

$[\text{Tau}]$ es la concentración de proteína Tau circulando en disolución a través del sensor. $\Gamma(ADN_i)$ y $\Gamma(ADN_i - \text{Tau})$ representan la concentración de ADN inmovilizado en la superficie activada por PHP, y la concentración del complejo ADN-Tau inmovilizado en dicha superficie, respectivamente.

Según el equilibrio dado por (2.1)

$$\Gamma(ADN_i) = \Gamma_{\max}(ADN_i - \text{Tau}) - \Gamma(ADN_i - \text{Tau}) \quad (2.3)$$

El término $\Gamma_{\max}(ADN_i - \text{Tau})$ representa la máxima concentración en superficie de Tau unido a ADN inmovilizado.

El aumento de reflectancia (R) registrado en los ensayos de RPS es proporcional a la concentración de moléculas en superficie (Stenberg et al., 1991) y por tanto, podemos establecer las siguientes igualdades:

$$R = \alpha \Gamma(ADN_i - \text{Tau}) \quad (2.4)$$

$$R_{\max} = \alpha \Gamma_{\max}(ADN_i - \text{Tau}) \quad (2.5)$$

Sustituyendo las ecuaciones (2.3), (2.4) y (2.5) en la ecuación cinética (2.2) resulta:

$$\begin{aligned} dR/dt &= k_1 [\text{Tau}] (R_{\max} - R) - k_{-1} R = \\ &= k_1 [\text{Tau}] R_{\max} - (k_1 [\text{Tau}] + k_{-1}) R \end{aligned} \quad (2.6)$$

Como la proteína Tau se suministra en flujo de forma continua, su concentración puede considerarse constante. En estas condiciones de pseudo-primer orden, la representación de dR/dt frente a la reflectancia R debe ser una línea recta, con pendiente igual a $(k_1 [\text{Tau}] + k_{-1})$. La constante k_{-1} fue obtenida a partir del ajuste de primer orden a la curva de disociación del complejo, midiendo en tiempo real la disminución en la reflectancia que tuvo lugar al sustituir la disolución de proteína Tau en flujo por tampón. De este modo, una vez hallado el valor de k_{-1} es posible obtener k_1 a partir de la pendiente de la recta.

La constante de equilibrio para la unión de Tau sobre ADN inmovilizado en superficie se define como:

$$K_{eq} = \frac{\Gamma(\text{ADNi-Tau})}{\Gamma(\text{ADNi}) [\text{Tau}]} \quad (2.7)$$

La fracción de saturación (Y) de la superficie del sensor, definida como el número de sitios de unión ocupados entre el número de sitios totales, viene dada por la expresión siguiente:

$$Y = \frac{\Gamma(\text{ADNi-Tau})}{\Gamma_{\max}(\text{ADNi-Tau})}$$

que según la ecuación (2.3), puede expresarse como:

$$Y = \frac{\Gamma(\text{ADNi-Tau})}{\Gamma(\text{ADNi-Tau}) + \Gamma(\text{ADNi})} \quad (2.8)$$

Despejando $\Gamma(\text{ADNi-Tau})$ en (2.7) y sustituyendo en (2.8) se obtiene:

$$Y = \frac{K_{eq} \Gamma(\text{ADNi}) [\text{Tau}]}{K_{eq} \Gamma(\text{ADNi}) [\text{Tau}] + \Gamma(\text{ADNi})}$$

$$Y = \frac{K_{eq} [\text{Tau}]}{K_{eq} [\text{Tau}] + 1} \quad (2.9)$$

Finalmente, dividiendo el numerador y el denominador de la expresión (2.9) por K_{eq} , se obtiene la ecuación:

$$Y = \frac{[Tau]}{[Tau] + 1/K_{eq}} \quad (2.10)$$

La ecuación (2.10) es una ecuación hiperbólica de Langmuir que describe la unión del ligando, en este caso Tau, a un conjunto de sitios de unión independientes sobre ADN inmovilizado. La representación de inversos de esta ecuación rinde la K_{eq} .

Los valores de la fracción de saturación en el equilibrio fueron fácilmente obtenidos dividiendo la reflectancia del complejo a cada concentración entre el valor máximo de reflectancia alcanzado. La relación entre la reflectancia y la concentración procede de sustituir las ecuaciones (2.4) y (2.5) en la ecuación original:

$$Y = \frac{\Gamma(ADNi-Tau)}{\Gamma_{max}(ADNi-Tau)} = \frac{R}{R_{max}} \quad (2.11)$$

2.1.2 Secuencias de los oligonucleótidos empleados en los ensayos de RPS

Las secuencias dadas pertenecen a las hebras sentido (*forward*) de cada oligo. Cada secuencia recibe el nombre del gen al que flanquea por el extremo 5'. MAPK14, MAPK14-1 y MAPK14-2 son tres secuencias situadas antes del inicio del gen MAPK14

APPHSE: 5'-GCTCTCGACTTTTCTAGAGC-3'

GSK3β: 5'-GAGGAGGAGTGGGGAAGTGC-3'

MAPK14: 5'-CTTCAGGATAGGAGTCAGTT-3'

MAPK14-1: 5'-CAAAAGCAGTGGGGTCTGAA-3'

MAPK14-2: 5'-GATCTGGAGTGGGACTTAGG-3'

TP53: 5'-TGATGGGATTGGGGTTTTCC-3'

2.2 Microscopía electrónica de transmisión

El microscopio electrónico irradia un haz de electrones que inciden sobre la muestra con un voltaje constante. Los electrones son dispersados en parte al atravesar la rejilla, y el haz transmitido se visualiza en una cámara CCD. Se adquirieron imágenes de entre 10000 y 50000 aumentos en rejillas de cobre cubiertas con un film de carbono-colodión, utilizando la técnica de tinción negativa. La técnica consiste en impregnar la muestra de interés con una sustancia opaca a los electrones, en este caso el acetato de uranilo. Este reactivo se deposita en los intersticios de las moléculas pero no en su interior, lo que genera un contraste que permite visualizar el perfil de cada molécula. Antes de tomar las imágenes, las rejillas, de 3 mm de diámetro y malla de 300 espacios, son sometidas a una descarga iónica en vacío para favorecer la adsorción de las moléculas. A continuación, la rejilla se deposita sobre una gota de 20 μ L de muestra por la cara cubierta con el film de carbono. Pasados 3 minutos, se limpia el exceso con papel de filtro y se coloca la rejilla durante 50 segundos sobre una gota de 20 μ L de acetato de uranilo al 2% en agua bidestilada. Por último se elimina el exceso de acetato con papel de filtro y se deja secar la rejilla durante unos minutos. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico JEOL 1010 equipado con una cámara TemCam-F416 (4096 x 4096 pixels, 15.6 μ m/pixel, TVIPS, GmbH) operando a 80 kV. Las imágenes se procesaron con el software EM-MENU 4.

2.3 Purificación de proteína Tau recombinante en bacterias

2.3.1. Transformación de bacterias *E.coli* por electroporación

El plásmido pRKT-42 donado por el doctor Michel Goedert (MRC, Cambridge, UK) contiene el gen que codifica la isoforma completa de la proteína Tau (441 aminoácidos, 4 repeticiones y 2 insertos). Dicho plásmido se introdujo en bacterias electrocompetentes *E.coli* BL21 (DE3) mediante electroporación, una técnica que consiste en aplicar pulsos eléctricos con el fin abrir pequeños poros en la membrana de la bacteria y permitir la entrada del ADN. Se añadieron 50 ng de plásmido a 40 μ L

de bacterias y la mezcla se colocó en una cubeta de electroporación para el Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA) previamente enfriada en hielo. A continuación se comunicó a la cubeta un pulso de unos 25 kV/cm. Inmediatamente se añadió 1 mL de medio SOC (Super Optimal broth with Catabolic repressor) a las bacterias, que fueron transferidas a un tubo estéril de 10 mL e incubadas 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, las bacterias se sembraron en 3 placas de LB-agar con ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Dado que el plásmido introducido contiene un gen de resistencia a ampicilina, sólo aquellas bacterias que lo incorporan pueden crecer en el medio con antibiótico y ser seleccionadas.

2.3.2. Cultivo de bacterias a pequeña y gran escala

Al día siguiente se picaron colonias aisladas de cada placa con puntas de pipeta estériles y se crecieron en un matraz con 20 mL de medio LB, glucosa estéril 40 mM y ampicilina filtrada 100 µg/mL durante toda la noche a 37°C en agitación. 5 mL de este minicultivo se añadieron a cada uno de los 4 matraces con 1 L de medio LB y ampicilina filtrada 100 µg/mL.

2.3.3. Inducción de la expresión de la proteína Tau por IPTG

La cepa de *E.coli* BL21 (DE3) es portadora del gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, que está bajo control del promotor lacUV5. La adición de IPTG al cultivo induce la expresión de la polimerasa, que transcribe el gen de Tau contenido en el plásmido pRKT-42 y da lugar a la posterior síntesis de la proteína.

Los cuatro cultivos bacterianos se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, que corresponde aproximadamente a una densidad óptica de 0.6–0.7 unidades a 600 nm. En este momento se separó un mL de cultivo como control de cultivo no inducido, y al resto se le añadió IPTG a una concentración final 0.4 mM. Después de una incubación de 2 horas a 37°C con agitación, las bacterias se precipitaron por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos (GSA rotor, Sorvall, CO, EE.UU). Se tomó una muestra de cada cultivo inducido y a continuación comprobamos que se produjo la expresión de la proteína Tau mediante electroforesis en gel de acrilamida.

2.3.4. Lisis bacteriana

El precipitado de bacterias se resuspendió en 20 mL de tampón de sonicación, compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 7.5, MgCl_2 0.5 mM, EGTA 1 mM, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM, β -Mercaptoetanol 4 mM y en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas 1x (Roche Applied Science, IN, USA). Las bacterias fueron lisadas en hielo utilizando un sonicador de aguja Labsonic U (Braun, Melsungen, Germany) aplicando ultrasonidos de 40W durante 1 minuto, con un total de 5 repeticiones a intervalos de 30 segundos. La mezcla sonicada se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C (rotor JA 25.50, Beckman) y el sobrenadante obtenido se guardó en hielo. Por otro lado, el precipitado se resuspendió de nuevo en 5 mL de tampón de sonicación y volvió a sonicarse en las mismas condiciones que antes. Finalmente, el sobrenadante se añadió al obtenido en la sonicación anterior y se purificó en las siguientes etapas.

2.3.5. Eliminación de ácidos nucleicos y proteínas bacterianas

El lisado se hierve durante 10 minutos. De esta manera se consigue inducir la precipitación de proteínas bacterianas y mantener en disolución la proteína Tau, que es termoestable. La fracción insoluble se separó mediante centrifugación a 13000 rpm 30 minutos a 4°C (rotor JA 25.50, Beckman) obteniendo un volumen de sobrenadante de 43 mL, que se incubó en hielo para evitar la degradación de proteína Tau.

El ADN genómico de la bacteria también es una fuente importante de contaminación y su eliminación se lleva a cabo en varias etapas. En primer lugar, el sobrenadante se incuba en hielo con ácido perclórico (HClO_4) a una concentración final del 2.5% en volumen ($\sim 0.4\text{M}$) durante 15 minutos, y se centrifuga a 17000 rpm 45 minutos a 4°C (rotor JA 25.50, Beckman). Tau es soluble en HClO_4 y permanece en el sobrenadante, que se somete a precipitación fraccionada añadiendo lentamente y con agitación continua una solución saturada de sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%. La mezcla se incuba durante 1 hora a 4°C, y tras centrifugar a 17000 rpm 30 minutos a 4°C (rotor JA 25.50, Beckman), se toma una muestra del sobrenadante y se mide la absorbancia a 260 nm para comprobar que contiene una gran cantidad de ácidos nucleicos. El pellet se resuspende en 13 mL de tampón de sonicación, se lava de nuevo con HClO_4 al 2.5% (v/v) y se centrifuga a 17000 rpm 30 minutos a 4°C (rotor JA 25.50, Beckman).

Finalmente, la proteína Tau precipitó al añadir glicerol al 25% en el sobrenadante. Después de centrifugar a 17000 rpm durante 15 minutos a 4°C en el mismo rotor, la proteína precipitada, que aparece como una fina película en el fondo del tubo, se disolvió en 1 mL de tampón de diálisis con inhibidores de proteasas, y se dializó toda la noche a 4°C frente a tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7. El protocolo de purificación descrito se elaboró sobre la base del método original desarrollado en los años 80 (Lindwall & Cole, 1984).

2.3.6. Determinación de la concentración y pureza de la proteína Tau

Se verificó mediante espectroscopía UV y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema tipo Hoefer SE 250. El gel separador se compone de acrilamida al 8% con una relación de Acrilamida:Bisacrilamida 30:0.5, tampón Tris-Cl⁻ 1 M pH 8.8, APS 50 mg/mL, 50 µL de SDS 10% y 5 µL de TEMED. Cargamos 4 mL de esta disolución entre los cristales del equipo y añadimos 1 mL de agua destilada para facilitar la correcta polimerización del gel. Una vez polimerizado, se desechó el agua y se añadió el gel concentrador, compuesto por acrilamida al 5% con una relación de Acrilamida:Bisacrilamida 40:2, tampón Tris 1 M pH 6.8, APS 50 mg/mL, 50 µL de SDS 10% y 10 µL de TEMED. El gel se colocó en la cubeta de electroforesis previamente cubierta con tampón, compuesto por Tris 150 mM, glicina 0.19 M y SDS 0.1 %. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 5X (Tris 1 M pH 6.8, SDS 10 %, glicerol 25%, β-Mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.5%) se hirvieron durante 3 minutos y se cargaron en el gel concentrador. La electroforesis se inició aplicando un voltaje constante de 80V hasta alcanzar el gel separador, momento en el que se aumentó a 110V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en solución de tinción de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250 0.1%, metanol 45% y ácido acético 9%) durante 20 minutos. Para visualizar las bandas de proteína, el gel se lavó en una solución de ácido acético al 7.5% y metanol al 5%. Usamos albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, USA) como marcador, pues su masa molar (~66000 g/mol) es cercana a la masa aparente de Tau en gel (67000 g/mol, Goedert et al., 1990). Comparando la intensidad de su banda con las de albúmina (Figura 2.4), se puede concluir que la banda de Tau presenta una concentración próxima a 3 µg/ 4 µL.

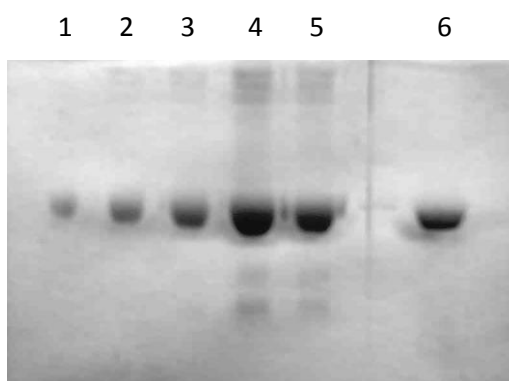


Figura 2.4 Electroforesis en gel SDS-PAGE de proteína Tau purificada en *E.coli*. Los carriles 1, 2, 3, 4 y 5 contienen 0.5, 1, 2, 4 y 5 µg de albúmina bovina, respectivamente. En el carril 6 se cargaron 4 µL de Tau.

El espectro de absorción UV de Tau indica que la pureza de la muestra obtenida es elevada. El máximo de absorción se encuentra a 274 nm, debido a los aminoácidos aromáticos de Tau, principalmente tirosinas (Fig. 2.5). Suponiendo que la absorbancia (A) a 260 nm se debiera únicamente al ADN, y aplicando la ley de Lambert-Beer:

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot l \quad (2.12)$$

se obtiene una concentración máxima de ADN: $C = 0.013 \text{ mg/mL}$. El coeficiente de extinción de Tau a 280 nm: $\varepsilon = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ es muy inferior al del ADN. Por tanto, si consideramos que la absorbancia de Tau a 280 es aproximadamente la mitad de la observada, obtenemos una concentración próxima a 0.8 mg/mL, que coincide con la estimada en el gel. Por ello, la impureza de ADN en la muestra sería del orden del 1%.

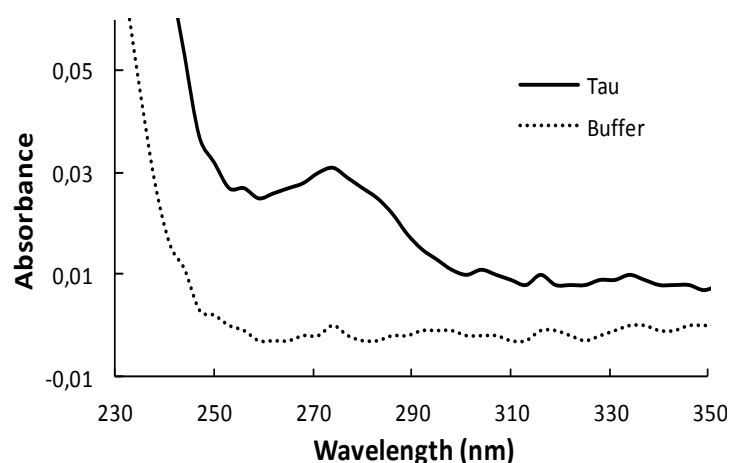


Figura 2.5: Espectro ultravioleta de Tau purificado en *E.coli*, disuelto en tampón HEPES/NaCl. Los espectros de Tau y de tampón se registraron en un NanoDrop con un paso de luz $l = 0.1 \text{ cm}$.

La proteína Tau fosforilada fue purificada por el grupo del Dr. Jesús Ávila en un sistema de expresión eucariota, siguiendo un protocolo ya publicado (Gómez-Ramos et al., 2004). Brevemente: se infectó una monocapa de células Sf9 de insecto (3×10^7 células/ mL) con baculovirus que contenían ADN complementario de la isoforma completa de Tau (Tau-42). Tras una incubación de 72 horas a 27°C las células fueron sonicadas y el sobrenadante obtenido al centrifugar el lisado celular se hirvió y centrifugó para eliminar otras proteínas. A continuación se añadió al sobrenadante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado al 50% y se incubó a 4°C toda la noche para precipitar la proteína Tau fosforilada. El precipitado obtenido por centrifugación se disolvió en 1 mL de PBS y se dializó frente a tampón Mes 0.1 M, EGTA 2 mM, MgCl_2 0.5 mM, pH 6.7. La pureza y concentración de la proteína se comprobó por gel y espectroscopía UV (Figura 2.6). La fosforilación de Tau en diferentes residuos de serina y treonina fue detectada por los siguientes anticuerpos: AT8 (residuos S202 y T205), AT180 (S235 y T231), AT100 (S214, T212), PHF-1 (S396 y S404) y 12E8 (S262 y/o S356).

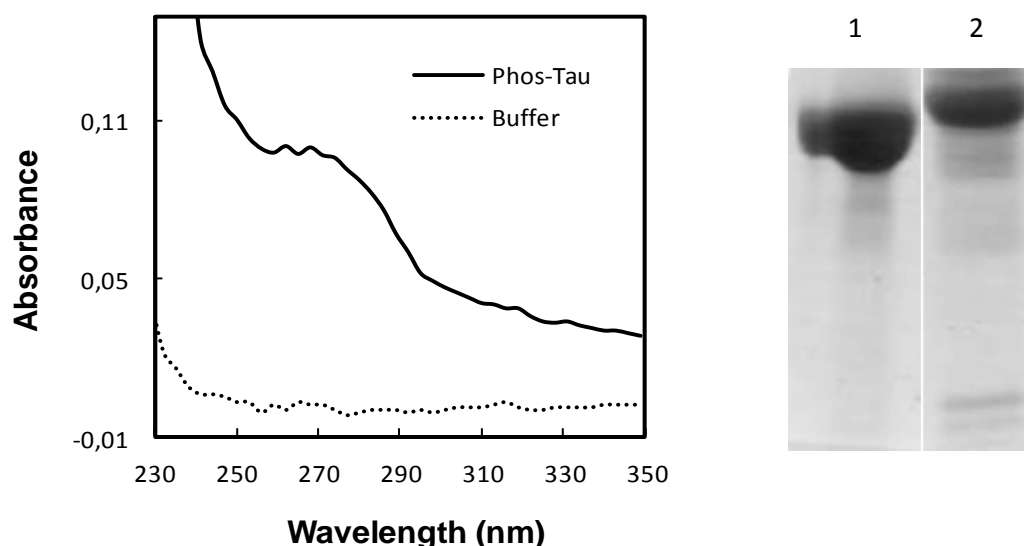


Figura 2.6: Izquierda. Espectro ultravioleta de Tau fosforilado, purificado en células Sf9 de insecto. Suponiendo que la absorbancia a 260 nm (~0.1) procediera íntegramente de ADN (desconocemos el coeficiente de absorción de Tau a esa longitud de onda) se estimó, según la ley de Lambert-Beer una concentración de ADN próxima a 0.05 mg/mL (Paso de luz del Nanodrop = 0.1 cm).

Derecha. Electroforesis en gel SDS-PAGE de Tau fosforilado: el carril 1 contiene 10 µg de albúmina y el carril 2, 10 µL de Tau fosforilado. Como las bandas muestran una intensidad similar podemos concluir que se purificó aproximadamente 1 mg/ mL de Tau fosforilado, con un porcentaje de ADN cercano al 5%.

2.4 Espectroscopía de absorción ultravioleta

2.4.1 Ensayos de interacción ADN-Proteína

El espectro de absorción ultravioleta se obtuvo registrando la absorbancia de la muestra a longitudes de onda comprendidas entre 200 y 300 nm. Los espectros UV se registraron en un espectrofotómetro de UV-visible de doble haz Thermo Scientific Evolution 300 (Thermo Scientific, MA, USA) del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, en una cubeta de cuarzo con un paso de luz de 1 cm (Starna Scientific, Essex, UK) a temperatura ambiente. Las medidas de volúmenes con pocos microlitros se realizaron en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, MA, USA) del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

2.4.2 Ensayos de fusión del ADN

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Coleman 55 (Maywood, USA) conectado a un baño termostático Hetofrig (Birkerød, Denmark) que bombea agua alrededor de la cubeta a la temperatura deseada. La muestra se introdujo en una cubeta de cuarzo con paso de luz de 1 cm (Starna Scientific, Essex, UK) y la temperatura se controló en una cubeta gemela con un termómetro acoplado. Se prepararon disoluciones de ADN a 8 µg/mL y de oligonucleótidos doble hebra de 20 pares de bases a 0.6 µM en tampón HEPES 10 mM NaCl 100 mM. El tampón se desgasificó previamente para eliminar burbujas de aire que generarían variaciones de absorbancia durante la fusión. La temperatura se incrementó a razón de 1°C por minuto para inducir la disociación progresiva de la doble hélice del ADN en sus dos cadenas simples. Debido al efecto hipercrómico del ADN monocatenario es posible monitorizar la fusión de ADN mediante el aumento de absorbancia a 260 nm. Los valores de absorbancia representados en función de la temperatura describen una curva sigmoidea que se ajusta a la función de Boltzmann mediante la ecuación (2.13):

$$A = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(T - T_m)/\Delta T}} + A_2 \quad (2.13)$$

donde A es la absorbancia medida a 260 nm y A_1 y A_2 los valores de absorbancia medidos en el límite inferior y superior de temperatura, respectivamente. T representa la temperatura y T_m la temperatura de fusión, donde la mitad de las bases del polinucleótido se encuentran desapareadas. El parámetro ΔT determina la anchura o grado de cooperatividad de la curva sigmoidea: cuanto más bajo sea su valor, mayor será la cooperatividad. La Figura 2.7 muestra estos parámetros en la curva de fusión.

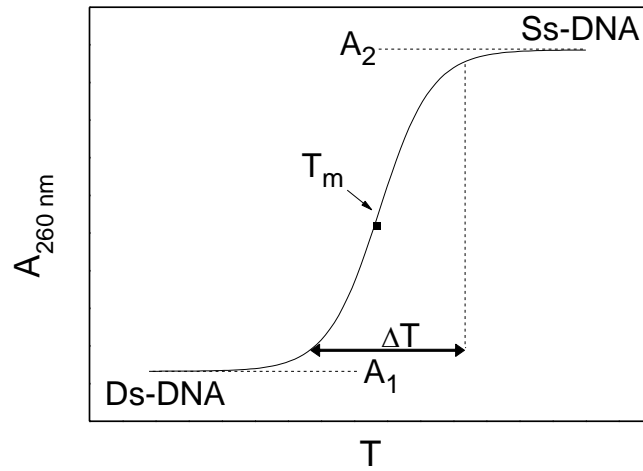


Figura 2.7: Esquema de la fusión de la doble hélice de ADN.

Nos basamos en un modelo de dos estados para describir la transición hélice-cadena del ADN, en el que los valores de absorbancia obtenidos derivan exclusivamente de un equilibrio entre pares de bases apareados y desapareados. Por tanto, la constante de equilibrio K_m del proceso de fusión del ADN puede expresarse como:

$$K_m = \frac{[\text{Bases desapareadas}]}{[\text{Bases apareadas}]} = \frac{A - A_1}{A_2 - A} \quad (2.14)$$

Sustituyendo A por la expresión dada en la ecuación (1) y operando, se obtiene:

$$K_m = e^{(T - T_m / \Delta T)} \quad (2.15)$$

Como vemos, la constante de equilibrio depende únicamente de la temperatura. Aplicando la ecuación de Van't Hoff a la expresión anterior se obtiene la variación de entalpía estándar para el proceso de fusión:

$$\Delta H^\circ = \frac{d(\ln K_m)}{dT} RT^2 = \frac{d(T - T_m/\Delta T)}{dT} RT^2 = \frac{RT^2}{\Delta T} \quad (2.16)$$

La variación de energía libre de Gibbs viene dada por:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_m = \frac{-RT(T - T_m)}{\Delta T} \quad (2.17)$$

Teniendo en cuenta que $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$, calculamos el incremento de entropía:

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T} = \frac{RT}{\Delta T} + \frac{R(T - T_m)}{\Delta T} \quad (2.18)$$

Por tanto, a la temperatura de fusión:

$$K_m = 1 \quad \Delta G^\circ = 0$$

$$\Delta H^\circ = \frac{RT_m^2}{\Delta T} \quad \Delta S^\circ = \frac{RT_m}{\Delta T}$$

2.5 Espectroscopía de resonancia Raman ultravioleta

La espectroscopía Raman difiere bastante de la espectroscopía de absorción, en cuanto que estudia la luz dispersada por una muestra en lugar de la luz absorbida. La espectroscopía de resonancia Raman ultravioleta mide la energía dispersada cuando la luz ultravioleta de un láser monocromático interacciona de forma inelástica con la molécula objeto de estudio. La dispersión Raman se calcula como la diferencia entre la intensidad original del láser y la registrada después de incidir sobre la muestra. Como este tipo de dispersión no es muy intensa, es preciso seleccionar una longitud de onda incidente que provoque resonancia en la muestra. El fenómeno de resonancia

ocurre cuando la frecuencia de excitación coincide con la frecuencia natural de absorción electrónica de la molécula, dando lugar a la transición de electrones a niveles excitados de energía. Estas transiciones derivadas de la resonancia amplifican la intensidad de la dispersión Raman y confieren mayor selectividad a la técnica. Excitando la muestra a longitudes de onda inferiores a 260 nm se impide la emisión de fluorescencia, que interferiría con la dispersión Raman.

2.5.1 Preparación de muestras

Los péptidos A β ₂₅₋₄₀ y A β ₁₋₄₀ se purificaron a partir de péptido crudo con impurezas sintetizado en la Universidad de Missouri-Columbia. La purificación se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa, empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo, metanol y agua y una columna C₁₈ Beckman-Coulter (Fullerton, CA, USA). La pureza de cada péptido se verificó por espectrometría de masas (ESI-MS). Las fracciones que registraron los picos de elución de péptido puro se liofilizaron en vacío, obteniendo un sólido que se almacenó a -80°C. Las muestras se disolvieron en tampón fosfato 10 mM pH 7.4 con perclorato sódico 50 mM y fueron sonicadas durante 10 minutos para romper cualquier posible agregado. Se prepararon disoluciones de péptidos A β 60 μ M, según se estimó por espectroscopía ultravioleta, haciendo uso del coeficiente de extinción molar de la tirosina a 280 nm en el caso del péptido A β ₁₋₄₀ (1280 M⁻¹ cm⁻¹) y del coeficiente de extinción del enlace peptídico a 215 nm (17385 M⁻¹ cm⁻¹) para el caso del A β ₂₅₋₄₀. En los ensayos de interacción ADN-amiloide incubamos las disoluciones de péptido con ADN de doble cadena (UltraPure salmon DNA, Invitrogen, Carlsbad, USA).

2.5.2 Registro de espectros

Los espectros de dispersión Raman se obtuvieron usando el cuarto armónico de un láser Titanio-Zafiro con una frecuencia de 4 kHz (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA). El láser de Titanio-Zafiro fue pulsado con un láser Nd-YLF bombeado por diodo de frecuencia doble (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA). Las muestras fueron excitadas a 197 nm, recibiendo una potencia media de 0.5 mW para evitar la degradación. Las muestras se introdujeron en un recipiente a medida (Mid Rivers Glassblowing, Saint Charles, MO, USA) y se circularon mediante una bomba de

engranajes modelo 75211-10 (Cole Palmer, Vernon Hills, IL, USA) formando una fina película entre dos alambres de nitinol espaciados 1 mm, sobre los que incide el láser. La muestra fue circulada a flujo constante en una cámara con suministro continuo de gas nitrógeno para eliminar oxígeno del ambiente. La dispersión Raman se recogió con una geometría retrodispersada de 135° usando un espectrómetro de 1.25 m (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA) con 3600 surcos/mm. El espectrómetro está equipado con una cámara CCD Symphony fosforescente enfriada con nitrógeno líquido (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA) con un tamaño de chip de 2048×512 pixels. La máxima resolución del instrumento es aproximadamente 0.6 cm^{-1} . Los pixels se organizaron en incrementos de cuatro en dirección horizontal para mejorar la relación señal/ruido y alcanzar una resolución final de 2.4 cm^{-1} . Los espectros se calibraron usando como referencia un espectro del ciclohexano y se exportaron usando el programa Synergy (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA). Se promediaron 48 ciclos de 5 barridos de 1 minuto para cada espectro, recogidos en un total de 4 horas. Las muestras contienen NaClO_4 50 mM como control interno, con un pico de intensidad a 932 cm^{-1} .

2.5.3 Procesamiento de espectros

Los espectros fueron procesados usando Matlab 7.1 (Math-Works, Natick, MA, USA). Los picos de intensidad alejados del valor medio para cada espectro se eliminaron mediante un programa escrito en Matlab y programado en el laboratorio. Se recogió un espectro del tampón fosfato como blanco y se escaló hasta coincidir con el espectro de cada muestra en la región comprendida entre $1750\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$. A continuación se restó al espectro crudo, para eliminar la contribución del agua en las muestras. El método de sustracción, desarrollado por el grupo de la doctora JiJi, se detalla en el siguiente artículo (Simpson et al., 2011). Para obtener las posiciones exactas de los picos se realizó la deconvolución de los espectros con una mezcla de funciones Gaussianas y Lorentzianas ejecutando un ajuste no lineal de mínimos cuadrados programado en el laboratorio. Los espectros representan la intensidad de la dispersión Raman en función del número de onda. Estrictamente hablando, el desplazamiento Raman (*Raman Shift*) significa un cambio de energía respecto a la luz de excitación, y por tanto debería indicarse en el eje x como Δcm^{-1} . No obstante,

hemos optado por la notación más extendida, en cm^{-1} , dejando el incremento implícito. La purificación de los péptidos amiloides, el registro de los espectros Raman y su procesamiento posterior, formaron parte del trabajo realizado por el doctorando durante su estancia en el laboratorio de la doctora Renee D. JiJi y el doctor Jason W. Cooley, en la Universidad de Missouri-Columbia (Estados Unidos de América).

2.6 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Esta técnica permite determinar la estructura secundaria de moléculas a partir de los modos de vibración de sus enlaces en la región infrarroja del espectro electromagnético. Se basa en la absorción de energía por parte de la molécula cuando se hace incidir sobre ella radiación con longitudes de onda comprendidas entre 2.5 y 25 μm (IR medio). La obtención de distintos picos o bandas de absorción está directamente relacionada con la longitud de onda a la que ha absorbido energía cada enlace. El espectrofotómetro que utilizamos (IRAffinity-1, Shimadzu, Japan) perteneciente al departamento de química física aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid, contiene un interferómetro de tipo Michelson con un espejo móvil y una serie de espejos fijos que miden de forma simultánea la absorción de energía a todas las longitudes de onda emitidas sobre la muestra. La señal registrada en el detector genera un interferograma, que representa la intensidad de luz detectada en función de la posición del espejo móvil. La transformada de Fourier es una operación matemática que convierte el interferograma en un espectro que representa la absorbancia de la muestra a cada número de onda. El número de onda ($\bar{\nu}$) se expresa en cm^{-1} y se define como el número de longitudes de onda (λ) que hay en 1 cm. Es decir, el número de onda es igual al inverso de la longitud de onda incidente:

$$\bar{\nu} = 1/\lambda \quad (2.19)$$

2.6.1. Adsorción de proteínas en gel

Para obtener espectros de péptidos o proteínas en condiciones nativas es necesario trabajar a una concentración muy elevada que permita compensar la importante contribución del agua a las diferentes bandas de absorción. Un método

sencillo y fiable para conseguir este propósito consiste en concentrar la proteína adsorbiéndola en un gel (Dong et al., 2006). El gel de fosfato de aluminio comercializado como Adju-Phos 2% (Brenntag, Denmark) posee un punto isoeléctrico cercano a 5 y permite la adsorción de moléculas cargadas positivamente a pH fisiológico, como la histona o el péptido A β ₂₅₋₃₅. Se preparó una disolución de histona a 1 mg/ mL en 1 mL de tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM pH 7 y una disolución de A β ₂₅₋₃₅ a 1 mg/ mL en 1 mL de agua bidestilada pH 6.5. El gel se lavó en primer lugar con el medio de cada muestra y se precipitó por centrifugación durante 2 minutos a 13000 rpm. El precipitado se dividió en dos volúmenes de 50 μ L: uno de ellos se usa como control para obtener el espectro IR del gel y el otro se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación con la proteína que se desea adsorber. La mezcla gel-proteína se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en el caso de la histona y a 240 nm en el caso del péptido. El sobrenadante, que contiene la fracción de muestra no adsorbida, dio valores de absorbancia muy inferiores a los obtenidos antes de añadir el gel, confirmando que prácticamente la totalidad de la proteína quedó adsorbida en el gel.

2.6.2. Registro de espectros IR

Las muestras recién concentradas en gel fueron recogidas y depositadas en ventanas de CaF₂ (Edmund Optics, Barrington, USA) con ayuda de una pequeña espátula diseñada ex profeso para este fin. Una gota de unos 20 μ L es suficiente para generar un espesor homogéneo entre las 2 ventanas. Los parámetros elegidos en la toma de espectros fueron: 100 scans, resolución de 2 cm⁻¹ y la función de apodización Happ-Genzel, todo ello con el fin de conseguir una elevada relación señal/ruido.

Una vez obtenidos los espectros de histona y del péptido amiloide adsorbidos en el gel, se registró un espectro control del gel. Este espectro contiene principalmente las bandas de absorción del agua líquida adsorbida en el gel, y debe restarse al espectro de proteína en gel siguiendo el mismo criterio establecido para la eliminación del espectro del agua en muestras acuosas (Dong et al., 1990). Finalmente, tomamos un espectro del aire que contiene el agua vapor acumulado a lo largo del ensayo, para restárselo al espectro de la muestra y obtener el espectro diferencia de la proteína.

2.6.3. Procesamiento de espectros IR y cálculo de estructura secundaria

Dado que la región del espectro entre 1750 y 2000 cm^{-1} sólo presenta absorción debida al agua, los espectros de proteína en gel y de gel control deben ser igualados en esta zona (Dong et al., 1990). El espectro del gel se multiplicó por un factor de escala hasta situarlo al mismo nivel que el de la proteína en dicho intervalo. El espectro diferencia resultante debe ser una línea recta con absorbancia cero en la región citada siempre que la sustracción del agua se haya realizado correctamente. Un problema añadido en nuestro sistema viene generado por el vapor de agua. Al carecer de un circuito que purgue el aire del ambiente de forma continua, el espectrofotómetro albergará siempre un pequeño volumen de agua en estado gaseoso que interfiere en los espectros de absorción de las muestras. Por este motivo, registramos al término de las medidas un espectro en ausencia de muestra para obtener los picos característicos del vapor de agua.

El espectro real de la proteína se obtiene restando el espectro de vapor de agua a la diferencia entre la proteína adsorbida y el gel. El cálculo de la segunda derivada nos permite estimar si se ha eliminado por completo la señal del agua en los espectros de proteína (Dong et al., 1990). Ni el espectro de la histona ni el del péptido amiloide presentaron picos característicos de la segunda derivada del agua en las posiciones 1684, 1670, 1662, 1653, 1646 y 1617 cm^{-1} . Los espectros se suavizaron aplicando la función de Savitzky-Golay con una ventana de 5 puntos. Limitamos el intervalo de análisis a la banda de absorción de la amida I, comprendida entre 1700 y 1600 cm^{-1} , y le aplicamos una corrección de línea base. Tomamos como referencia la posición de los mínimos de la segunda derivada del espectro de proteína para hallar los centros de las bandas asignables a cada estructura secundaria. La deconvolución de la banda amida I se llevó a cabo ajustando los distintos picos a la función Gaussian del software Origin 8.6. El área relativa de cada banda de absorción se obtuvo al dividir entre el área total de la amida I, y la asignación de estructura secundaria se realizó conforme a las siguientes referencias (Kong et al., 2007; Munishkina et al., 2004; Zandomeneghi et al., 2004).

3

Resultados

3.1 Interacción Tau-ADN

3.1.1 Efecto de la fosforilación de Tau en la interacción con ADN

Teniendo en cuenta que la presencia de Tau en el núcleo neuronal se confirmó hace años (Loomis et al., 1990) resulta llamativo el escaso número de publicaciones que se ha dedicado a estudiar la posible interacción entre la doble hélice del ADN y la proteína Tau. Recientemente se ha comprobado que esta proteína, conocida sobre todo por estar alterada en enfermos de Alzheimer, se une al ADN en situaciones de estrés neuronal ejerciendo un papel protector (Sultan et al., 2011; Lu et al., 2013). Puesto que toda interacción funcional debe necesariamente ser reversible, sería de gran interés demostrar la reversibilidad de la unión Tau-ADN *in vitro*. Para llevar a cabo ensayos de este tipo es imprescindible disponer de proteína Tau pura, carente de ADN. Siguiendo el protocolo de expresión y purificación en *E.coli* detallado en Materiales y métodos, obtuvimos una elevada concentración de Tau con un contenido de ADN inferior al 1%.

Los vectores de expresión bacterianos ofrecen la posibilidad de producir Tau en la forma nativa no fosforilada, lo que nos permitió estudiar la afinidad de su estructura por la del ADN en ausencia de modificaciones postraduccionales. Para analizar el efecto que ejerce la fosforilación de la proteína Tau en la interacción con ADN, utilizamos una fracción diferente donada por el grupo del Dr. Jesús Ávila. Esta proteína fue purificada en células Sf9 de insecto, que contienen un gran número de quinasas capaces de fosforilar masivamente a Tau en serinas y treoninas. Como muestra de ADN de doble cadena utilizamos un extracto de timo de ternera (Sigma, St. Louis, USA) tratado con ADNasa I, una enzima que lo fragmenta en tamaños de varios miles de pares de bases. Aprovechando que la técnica de RPS registra cambios de señal en tiempo real, monitorizamos la interacción de Tau con ADN inmovilizado en la superficie del sensor. La Figura 3.1.1 muestra cómo la proteína Tau se une sobre ADN de doble hebra, mientras que Tau fosforilado no se une de forma significativa a la superficie. El resultado sugiere que los grupos fosfato incorporados por Tau pueden debilitar la interacción entre Tau y ADN, tal vez por medio de repulsión electrostática.

Para validar este experimento comprobamos que Tau fosforilado es capaz de unirse a otro tipo de superficie. En la Figura 3.1.2, la misma muestra de Tau fosforilado se circula a la misma concentración sobre la superficie del sensor, esta vez activada con polilisina, un polímero con gran densidad de carga positiva.

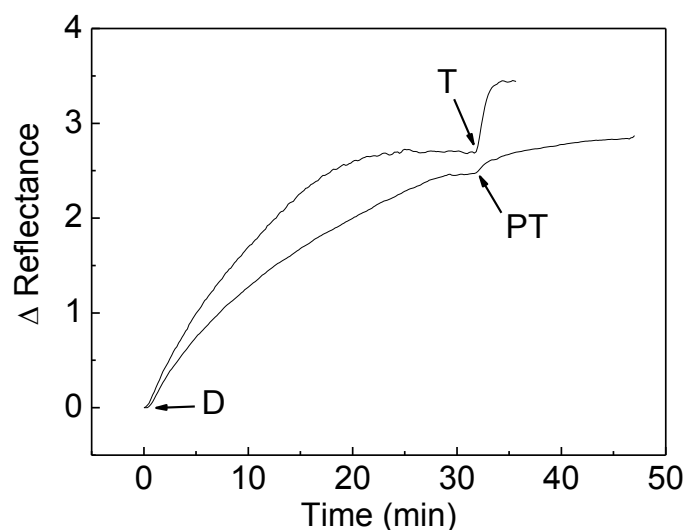


Figura 3.1.1: Ensayo de resonancia de plasmón superficial. La proteína Tau purificada en *E.coli* (T) y la proteína Tau fosforilada (PT), fueron inyectadas a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre ADN de doble hebra (D) a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inmovilizado en la superficie del sensor activada por polilisina. El incremento de reflectancia se estandarizó dividiendo el valor absoluto de cada curva entre el valor de reflectancia de la polilisina.

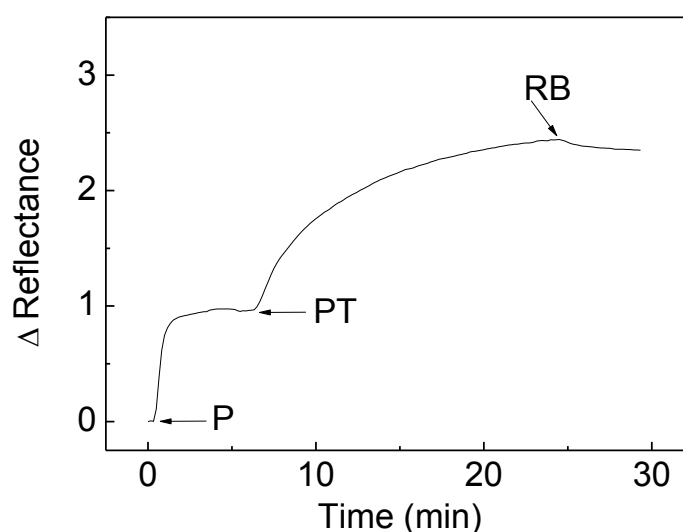


Figura 3.1.2: Proteína Tau fosforilada (PT) 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la superficie del sensor activada por polilisina (P) a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el punto señalado como RB se circuló tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.

RESULTADOS

Dado que en neuronas el ADN se encuentra unido a histonas prácticamente de forma permanente, quisimos comprobar si la proteína Tau fosforilada podría unirse a una mezcla de ADN e histonas en la que existe cierta carga positiva proporcionada por las lisinas y argininas de las histonas. Usamos una preparación comercial de histona no fraccionada (tipo II-A, Sigma, St. Louis, USA) que contiene todas las subunidades presentes en los nucleosomas de la cromatina. Como muestra la Figura 3.1.3, Tau fosforilado en eucariotas no interacciona con una mezcla ADN-histona inmovilizada sobre una monocapa de heparina. En cambio, la proteína no fosforilada se une a la mezcla generando una monocapa con un grosor similar al de una polilisina. Por tanto, la unión de Tau a la mezcla no puede estar mediada únicamente por interacciones electrostáticas. La fosforilación altera la hidrofobicidad de la proteína Tau y es de esperar que este cambio repercuta en su interacción con ADN e histona.

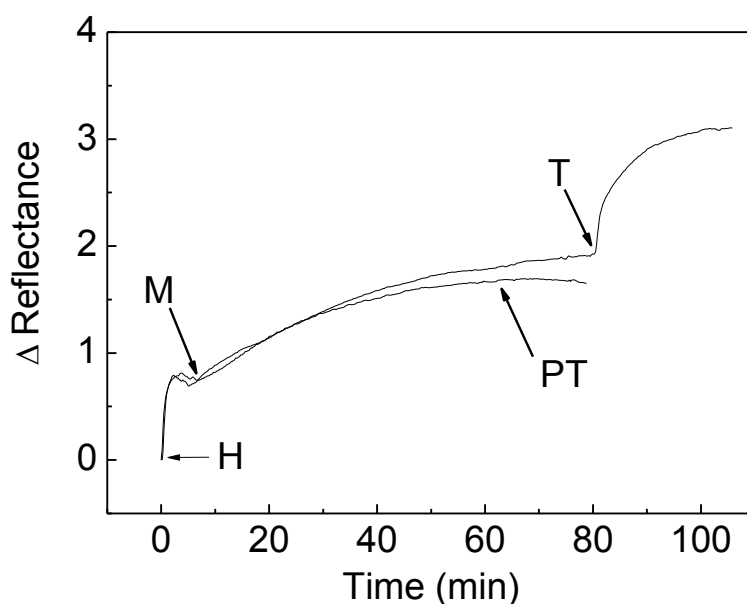


Figura 3.1.3: Proteína Tau (T) y proteína Tau fosforilada (PT) añadidas a 10 $\mu\text{g/mL}$ sobre una mezcla (M) de ADN (8 $\mu\text{g/mL}$) e histona no fraccionada (8 $\mu\text{g/mL}$). La mezcla de ADN e histona fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente antes de ser circulada sobre una monocapa de heparina (H).

A la vista de los resultados obtenidos con la proteína fosforilada, únicamente es posible estudiar la reversibilidad de la unión entre Tau no fosforilado y ADN.

3.1.2 Reversibilidad en la unión Tau-ADN. Cálculo de constantes termodinámicas

En un trabajo anterior de nuestro laboratorio se estimó que el espesor medio generado por una monocapa de polilisina sobre la superficie del sensor es del orden de 1 nm a pH 7 (Benítez et al., 2002). El incremento de reflectancia que se observa cuando la proteína Tau se une al ADN es muy similar al de la polilisina, lo cual sugiere que en estos ensayos de RPS estamos trabajando con monómeros o pequeños oligómeros de Tau que se apilan generando un espesor cercano a 1 nm. La Figura 3.1.4 muestra la unión reversible de Tau no fosforilado sobre ADN. Como se puede ver en la parte A, la proteína se une a la superficie de ADN hasta alcanzar la saturación. En ese momento la señal se estabiliza, y al circular tampón a través del sensor comienza la disociación del complejo formado. La curva de disociación se ajusta a la ecuación de un decaimiento exponencial (Parte C), que proporciona la constante cinética de primer orden k_{-1} . Por otra parte, la curva de crecimiento para la unión, que sigue una cinética de pseudo-primer orden, se analizó aplicando el mecanismo descrito en Materiales y métodos para finalmente obtener la constante cinética de segundo orden k_1 (ver inset en la parte B).

La constante de equilibrio (K_{eq}) para la formación del complejo Tau-ADN se obtuvo como un valor medio de 6 experimentos realizados en un intervalo de temperaturas entre 18°C y 22°C. $K_{eq} = k_1 / k_{-1} = (2.4 \pm 0.4) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, donde 0.4 corresponde al error estándar calculado para la media. Esta constante de equilibrio se calculó asumiendo el mecanismo simple de interacción descrito en Materiales y métodos para la formación del complejo Tau-ADN. No obstante, también es posible calcular esta constante de equilibrio prescindiendo de asunciones cinéticas, a través de la fracción de saturación (Y):

$$Y = \frac{[Tau]}{[Tau] + \frac{1}{K_{eq}}} \Rightarrow \frac{1}{Y} = K_{eq(D)} \frac{1}{[Tau]} + 1 \quad (3.1)$$

La pendiente de la recta que resulta al representar el inverso del grado de saturación frente al inverso de $[Tau]$ es igual a K_D (el inverso de la constante de formación).

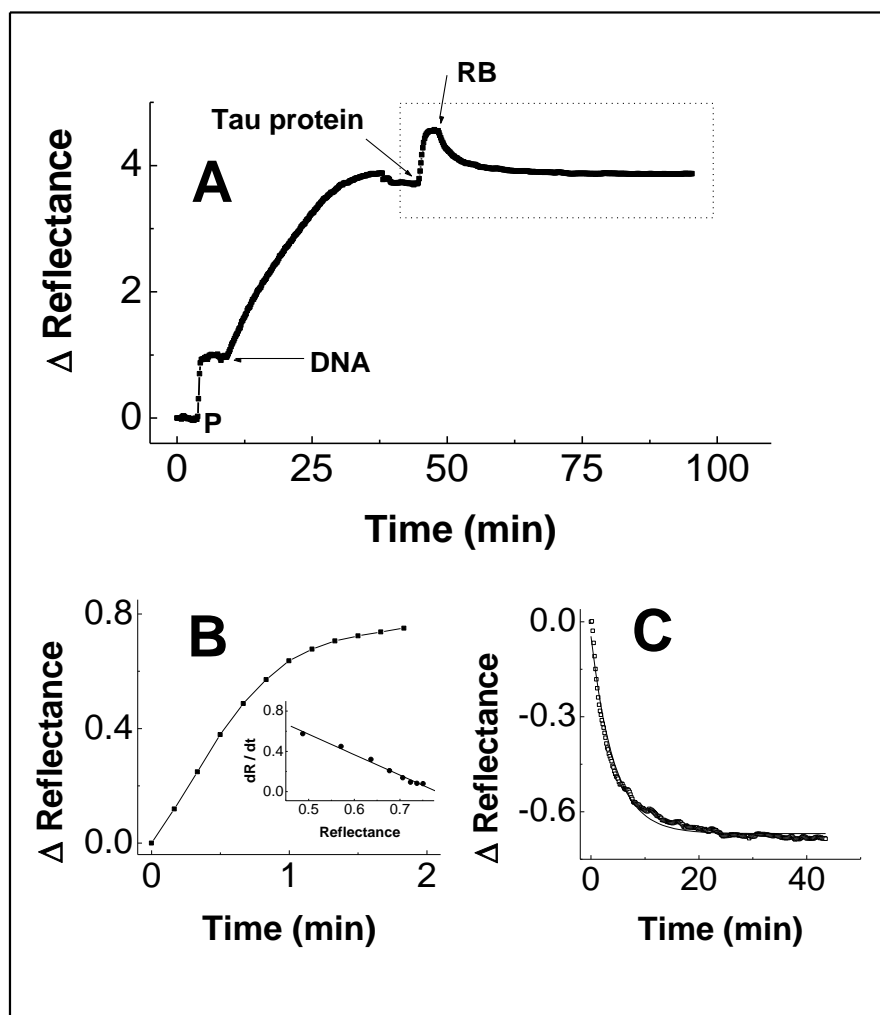


Figura 3.1.4: Unión reversible de la proteína Tau a ADN inmovilizado sobre la superficie del sensor
 Parte A: Evolución de la reflectancia durante la interacción Tau-ADN. Las disoluciones se bombearon a los tiempos indicados por las flechas: Polilisina (P: 40 μ g/ mL), ADN (8 μ g/ mL), Proteína Tau (18 μ g/ mL). En el punto indicado como RB dejamos de recircular Tau y en su lugar inyectamos *running buffer*, tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM pH 7 hasta que la reflectancia descendió al valor de partida. La formación y posterior disociación reversible del complejo se reprodujo con diferentes fracciones de Tau hasta aproximadamente un mes después de su purificación. A partir de entonces, las uniones Tau-ADN fueron irreversibles, probablemente debido a un proceso de agregación que alteró su afinidad por ADN. Las partes B y C muestran el análisis cinético de las curvas de asociación y disociación, respectivamente. El inset representa la derivada de la curva de asociación (parte B) en función de su reflectancia (R). La constante cinética de asociación (k_1) se calculó a partir de la pendiente de esta recta, siguiendo el proceso descrito en Materiales y métodos. Las curvas experimentales de disociación (parte C) se ajustaron a una función de decaimiento exponencial de primer orden. La constante cinética de disociación (k_{-1}) se calculó como el valor inverso del tiempo, dado por el ajuste, en que la reflectancia decae al 50% del valor inicial.

En la Figura 3.1.5A se observa cómo concentraciones crecientes de Tau conducen a una mayor saturación de la superficie. Esto indica que la superficie del sensor activada por ADN se satura en función de la concentración de ligando en flujo. La representación gráfica del inverso de la fracción de saturación frente al inverso de la concentración de Tau (Figura 3.1.5B) conduce a un valor de $K_{eq} = (2.3 \pm 0.6) 10^7 \text{ M}^{-1}$. Este valor para la constante de formación del complejo Tau-ADN coincide con el valor medio calculado previamente con el modelo cinético, y valida el mecanismo de una sola etapa asumido previamente. Por ello, es lícito usar el modelo cinético descrito para estudiar el efecto de la temperatura en la constante de equilibrio.

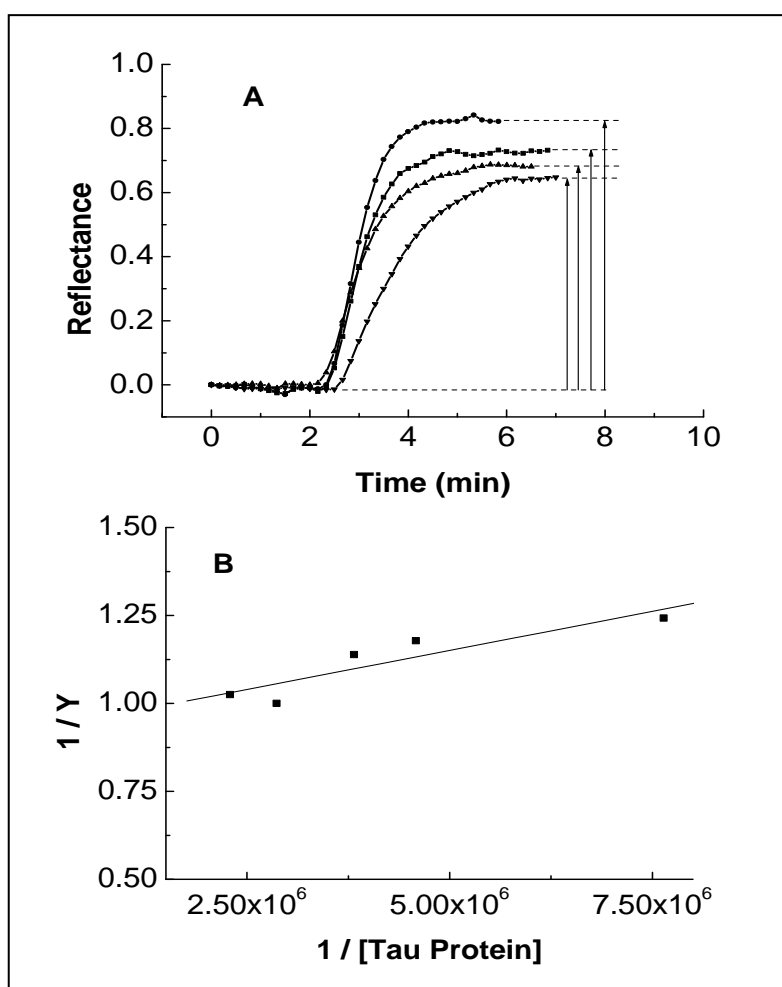


Figura 3.1.5: Equilibrio de saturación para la unión de Tau a ADN inmovilizado sobre el sensor

Parte A: Evolución de la reflectancia al circular disoluciones de Tau a diferente concentración en $\mu\text{g/mL}$: 16 (\bullet), 12 (\blacksquare), 10 (\blacktriangle), 6 (\blacktriangledown). Parte B: Representación de inversos de la fracción de saturación (Y).

RESULTADOS

Aplicando el modelo cinético anterior, calculamos las constantes de equilibrio para la formación del complejo Tau-ADN a temperaturas comprendidas entre 13°C y 33°C. Los resultados obtenidos, incluyendo aquellos entre 18°C y 22°C, se muestran en la Tabla 3.1.1. Se puede observar que las oscilaciones en el valor de las constantes de equilibrio no alcanzan ni siquiera medio orden de magnitud, por lo que puede decirse que el efecto ejercido por la temperatura en la constante de equilibrio es mínimo. La representación gráfica de la ecuación de Van't Hoff (Ecuación 3.2),

$$\frac{\partial \ln K_{eq}}{\partial (1/T)} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \quad (3.2)$$

en la Figura 3.1.6, proporciona el incremento de entalpía para la reacción de formación del complejo: $\Delta H^\circ = -32 \pm 15 \text{ kJ mol}^{-1}$. La diferencia de energía libre para la reacción de formación a 20°C se calculó a partir de la expresión que incluye la constante de equilibrio: $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} = -41.4 \pm 0.5 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Temperatura / °C	k_1 / min^{-1}	$k_1 \times 10^{-6} / \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	$K_{eq} \times 10^{-7} / \text{M}^{-1}$
13	0.17	5	2.9
15	0.13	5	3.8
18	0.27	4	1.5
19	0.22	3.3	1.5
21	0.36	5.3	1.5
21	0.14	4.8	3.4
22	0.24	5.2	2.2
22	0.15	6.1	4.1
26	0.4	7.4	1.8
32	0.32	3.2	1
33	0.33	4.9	1.4

Tabla 3.1.1 Constantes cinéticas de formación del complejo Tau-ADN (k_1) y de disociación (k_{-1}) junto a las constantes de equilibrio correspondientes, calculadas como el cociente k_1 / k_{-1} a distintas temperaturas.

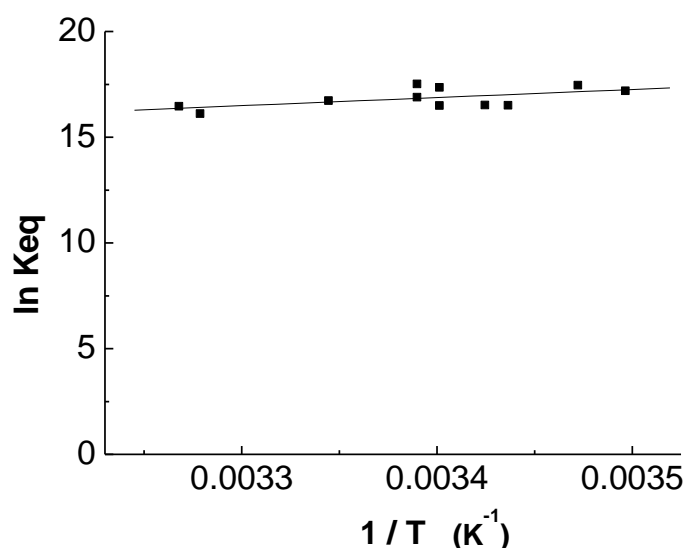


Figura 3.1.6: Representación de Van't Hoff de la dependencia de la temperatura en la constante de equilibrio para la formación del complejo Tau-ADN. Las 11 medidas de la constante equilibrio resultan del cociente entre las constantes cinéticas k_1/k_{-1} de la Tabla 3.1.1 a cada temperatura (en grados Kelvin).

En la gráfica vemos que la pendiente de la recta es prácticamente horizontal, lo que implica $\Delta H^\circ \sim 0$ y que la influencia de la temperatura en la constante de equilibrio es prácticamente nula. Por último, calculamos el incremento de entropía asociado a la reacción de formación del complejo mediante la relación $\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ)/T$, de la que resultó una variación pequeña y positiva: $\Delta S^\circ = 0.03 \pm 0.05 \text{ kJ mol}^{-1}$.

La estructura de la proteína Tau en disolución es aleatoria y puede adquirir un gran número de conformaciones con múltiples niveles cuánticos de energía asociados. Intuitivamente, cabe pensar que la unión de Tau a ADN reduciría su movilidad e implicaría el ordenamiento del sistema ($\Delta S^\circ < 0$). Sin embargo, el valor positivo de entropía obtenido indica que este efecto debe compensarse con un gran aumento en el número de niveles cuánticos disponibles tras la formación del complejo Tau-ADN. Este aumento de entropía podría ser el resultado de la liberación de moléculas de agua durante la reacción, lo cual indicaría que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la formación del complejo.

RESULTADOS

Por último, no hay que olvidar que la unión reversible de Tau sobre ADN se vio afectada por la agregación. Las imágenes de microscopía (sección 3.1.4) confirmaron que la proteína sufrió un proceso de agregación a temperatura ambiente que alteró su capacidad de unión al ADN. La cinética de disociación en superficie fue ralentizándose un mes después de la purificación de Tau. A partir del tercer mes ya fue imposible calcular constantes de disociación. La Figura 3.1.7 revela cómo al circular una muestra de Tau 6 meses después de su purificación sobre ADN inmovilizado en el sensor, se formó un complejo irreversible en superficie. Cuando circulamos tampón a través de la célula la reflectancia se mantuvo constante y la proteína no se disoció del ADN.

La agregación fisiológica de Tau debida a cambios postraduccionales ha sido relacionada repetidamente con citotoxicidad en el marco de la patología de Alzheimer. Las uniones irreversibles entre macromoléculas no suelen ser funcionales a largo plazo, así que cabe pensar que la proteína Tau podría provocar alteraciones en el núcleo neuronal en caso de quedar unida al ADN de forma permanente.

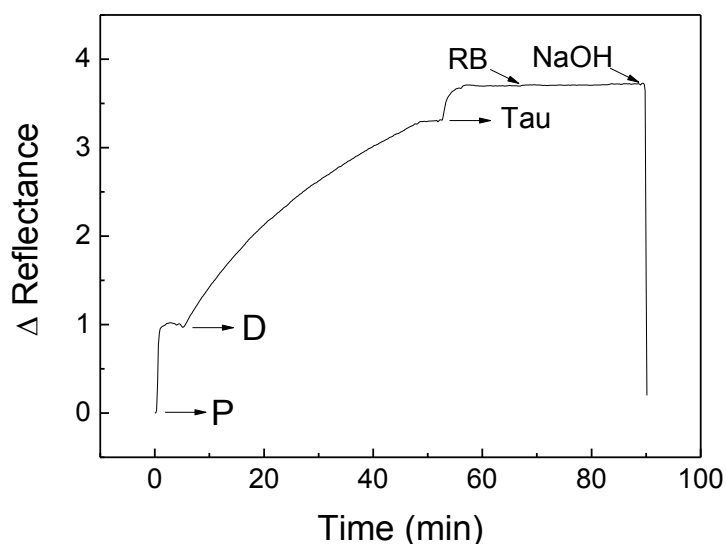


Figura 3.1.7: Unión irreversible entre ADN y proteína Tau agregada después de varios meses.

Sobre la superficie del sensor activada por polilisina (P) se circuló una disolución de ADN (D) a 8 $\mu\text{g/mL}$ y a continuación una muestra de proteína Tau (10 $\mu\text{g/mL}$) que fue purificada 6 meses antes del ensayo. En el punto indicado como RB, sustituimos la disolución de Tau en flujo por tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7. Se observa que en este caso la proteína no se disoció de la superficie. Para regenerar la superficie del sensor inyectamos una disolución de NaOH 100 mM, NaCl 100 mM al final del ensayo.

3.1.3 Efecto de la proteína Tau en la fusión de ADN

El proceso por el que la doble hélice de ADN se separa en dos cadenas individuales se conoce con el nombre de fusión, y ha sido estudiado desde hace años por medio de técnicas espectroscópicas que permiten calcular las magnitudes termodinámicas del proceso (Tibanyenda et al., 1984). Sin embargo, a día de hoy son muy pocos los trabajos disponibles en la bibliografía que hayan abordado este proceso en presencia de Tau. Nosotros monitorizamos por medio de absorción ultravioleta a 260 nm la fusión de varios tipos de ácidos nucleicos: ADN de timo de ternera y dos oligonucleótidos de 20 pares de bases, con el fin de extraer conclusiones acerca del papel fisiológico que podría tener la interacción Tau-ADN. Concretamente, elegimos dos secuencias que flanquean (*upstream*) el gen de la MAPK14, una quinasa involucrada en la hiperfosforilación de Tau. Distinguimos a estas dos secuencias como MAPK1 y MAPK2 según su proximidad al inicio del gen. La fusión de oligonucleótidos de pocos pares de bases es fácilmente reproducible, como muestra la Figura 3.1.8. Se observa cómo a medida que aumentamos la temperatura, a un ritmo de 1°C por minuto, la absorbancia de MAPK2 va en aumento desde 40°C hasta estabilizarse a 70°C. Después de enfriar la muestra hasta la temperatura de partida para permitir la hibridación de las dos cadenas, volvimos a repetir la fusión y obtuvimos el mismo resultado, demostrando que la fusión es completamente reversible.

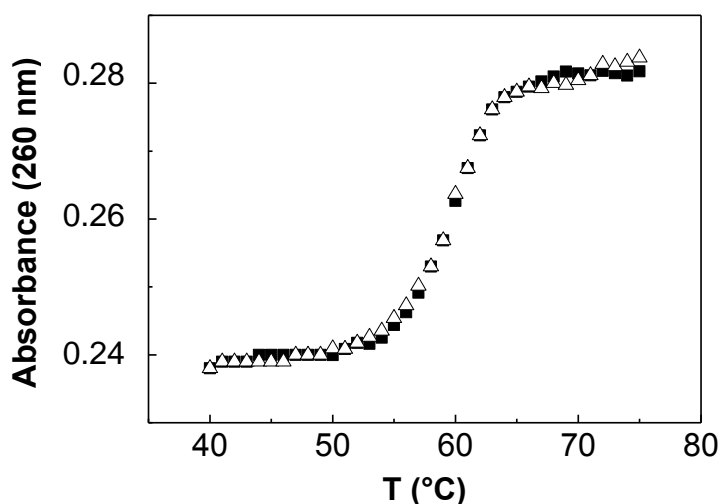


Figura 3.1.8: 1ª (Δ) y 2ª (■) fusión de MAPK2 0.6 μ M en tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.

RESULTADOS

La fuerza iónica y la concentración de oligonucleótido son factores que afectan a la sigmoicidad de la curva, variando el punto de fusión. En estos ensayos hemos trabajado a fuerza iónica fisiológica y a baja concentración de ambas hebras, lo que ha dado lugar a un punto de fusión relativamente bajo y nos ha permitido minimizar los errores que derivan de la evaporación del tampón a temperaturas elevadas. Ajustando los datos experimentales de absorbancia a la función de Boltzmann, y siguiendo el análisis termodinámico descrito en Materiales y métodos, calculamos el punto de fusión (T_m), la inclinación de la sigmoide (ΔT) y la variación de entalpía (ΔH) para el proceso de fusión. Dichos parámetros se muestran en la Tabla 3.1.2 para los ensayos de fusión de los oligonucleótidos y de ADN en presencia y ausencia de Tau. Aunque puede decirse que la proteína Tau no provoca cambios significativos en los puntos de fusión, sí que induce un claro aumento en el ΔT , que a su vez reduce la entalpía de fusión (ΔH) según la expresión 2.16 deducida previamente en el capítulo 2.

Ácido Nucleico	ΔT	$\Delta H / \text{kJ}$	T_m / K
Oligonucleótido MAPK1 (1 ^a)*	2.6 ± 0.1	355 ± 13	333.4 ± 0.1
Oligonucleótido MAPK1 (2 ^a)**	2.58 ± 0.06	355 ± 8	332 ± 0.1
Oligonucleótido MAPK1 (1 ^a)–Tau*	3.4 ± 0.1	270 ± 8	332.1 ± 0.1
Oligonucleótido MAPK1 (2 ^a)–Tau**	2.8 ± 0.1	331 ± 12	333.9 ± 0.1
ADN de timo de ternera***	2.48 ± 0.17	421 ± 29	354.3 ± 0.3
ADN – Tau***	3.2 ± 0.2	327 ± 19	354.7 ± 0.4
Oligonucleótido MAPK2****	2.06 ± 0.06	447 ± 11	332.7 ± 0.1
Oligonucleótido MAPK2-Histona (1:4)****	3.1 ± 0.1	294 ± 10	332.7 ± 0.1
Oligonucleótido MAPK2-Histona (1:2)****	3.96 ± 0.23	231 ± 14	332.2 ± 0.2
Oligonucleótido MAPK2-Histona (1:1.5)****	3.54 ± 0.20	257 ± 15	330.6 ± 0.2

Tabla 3.1.2: Parámetros de la fusión de ácidos nucleicos en presencia o ausencia de proteínas.

Leyenda: * Figura 3.1.9A, ** Figura 3.1.9B, *** Figura 3.1.9C, **** Figura 3.1.10.

ΔT determina la sigmoicidad de la curva: a medida que aumenta este parámetro disminuye la sigmoicidad. Por ello, el aumento en ΔT que experimentan los ácidos nucleicos en presencia de Tau, va asociado a un descenso en la sigmoicidad de las curvas de fusión como se aprecia en la Figura 3.1.9, y en definitiva, a una disminución en la cooperatividad del proceso. La transición doble hélice-cadena aleatoria del ADN puede explicarse mediante el modelo de cremallera (Zimm & Bragg, 1959). Según este

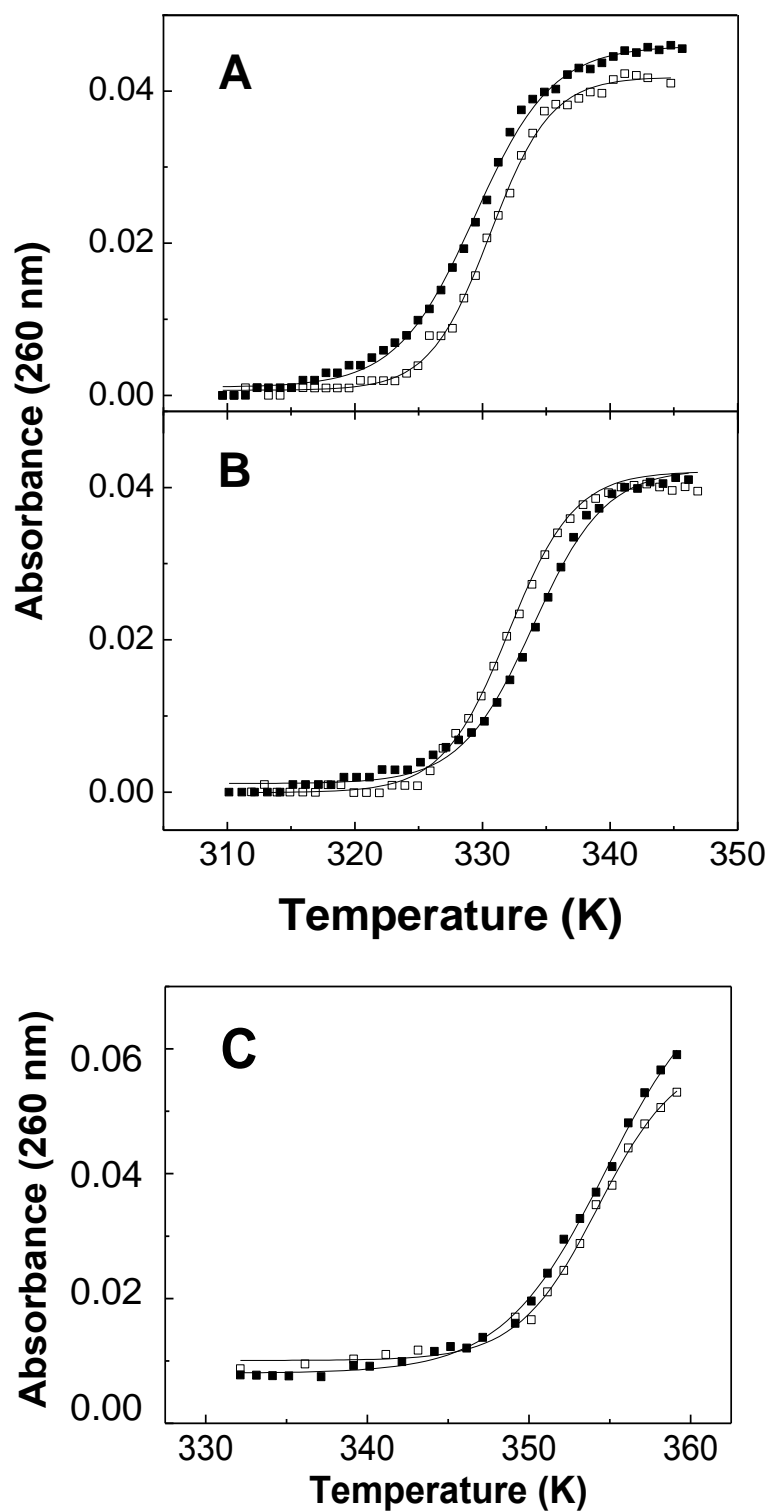


Figura 3.1.9: Partes A y B: 1ª y 2ª fusión respectivamente, de MAPK1 0.6 μ M en presencia (■) o ausencia (□) de Tau 0.015 μ M. **Parte C:** Fusión de ADN de timo de ternera a 10 μ g/mL en presencia (■) o ausencia (□) de Tau 0.22 μ M. Los datos experimentales se ajustaron a curvas de Boltzmann en todos los casos.

modelo, una vez que un polímero se abre en un punto, la probabilidad de que las cadenas vuelvan a separarse en un punto adyacente es mucho mayor a la probabilidad de que ocurra una nueva apertura en un punto distinto. El parámetro de nucleación σ , comprendido entre 0 y 1, determina la probabilidad de que ocurra la primera apertura. Cuanto mayor sea su valor, mayor será la probabilidad de que se produzca la apertura de un par de bases en un punto aislado. Puesto que tanto σ como ΔT se obtienen a partir de la anchura de la sigmoide, el aumento en el ΔT inducido por Tau puede interpretarse como un aumento en la probabilidad de abrir un par de bases aislado en el ADN. Este efecto conferiría flexibilidad a la doble hélice, permitiendo la apertura en puntos alejados entre sí a lo largo de un hipotético ADN empaquetado dentro del núcleo neuronal. Curiosamente, la histona produjo un efecto parecido a la vista de los perfiles de fusión mostrados en la Figura 3.1.10. En estos ensayos incubamos concentraciones crecientes de histona junto con el oligonucleótido de doble hebra MAPK2, observando de nuevo una pérdida de sigmoicidad respecto a la curva control, lo que se traduce, en un aumento del ΔT y una disminución en la energía (ΔH) necesaria para la apertura calculada en el punto de fusión.

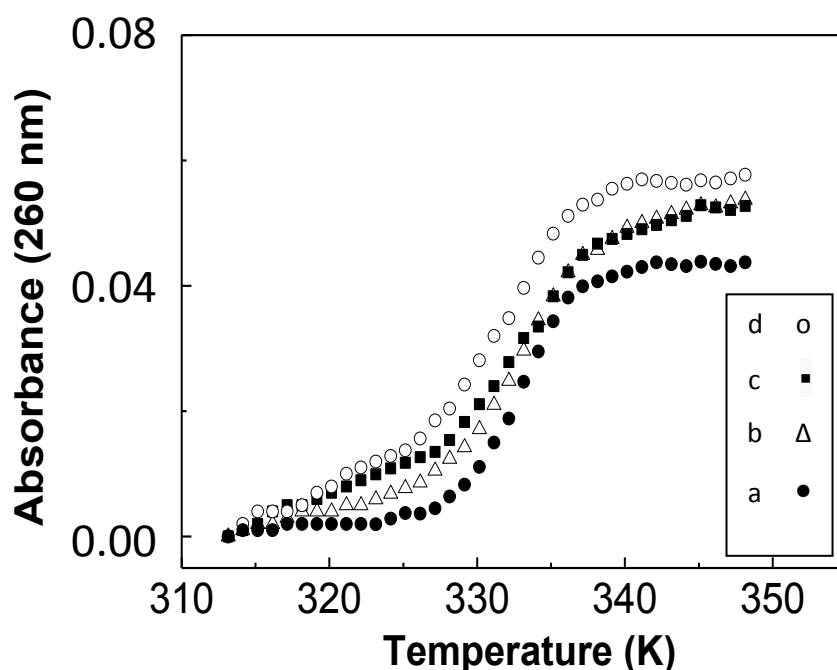


Figura 3.1.10: Fusión de dsMAPK2 0.6 μ M con distintas relaciones de histona no fraccionada. a) MAPK2 sin histona; b), c) y d) corresponden a las siguientes relaciones histona:oligo en masa: 1:4, 1:2 y 1:1.5.

3.1.4 Estudio de Tau y del complejo Tau-ADN por microscopía electrónica

Los parámetros termodinámicos obtenidos, muy similares tanto en la fusión de ADN unido a proteína Tau como en presencia de histona, indican que los complejos ADN-Tau y ADN-histona deben presentar también algún tipo de similitud desde un punto de vista estructural. Para comprobarlo, tomamos imágenes de microscopía electrónica mediante tinción negativa con acetato de uranilo. En primer lugar, estudiamos el tamaño y la forma de la proteína Tau purificada en *E.coli*, que se utilizó para el cálculo de las constantes cinéticas y en los ensayos de fusión descritos en anteriores apartados. La Figura 3.1.11A corresponde a una imagen de Tau tomada en la semana siguiente a su purificación, donde se puede apreciar un colectivo de pequeños oligómeros circulares. El tamaño de estos oligómeros es consistente con los valores de reflectancia obtenidos en los ensayos de RPS. Con el paso de los meses, pudimos constatar que la proteína Tau sufrió un proceso de agregación a temperatura ambiente, lo cual queda reflejado en la Figura 3.1.11B, donde el tamaño de los oligómeros es considerablemente mayor al observado en las primeras semanas.

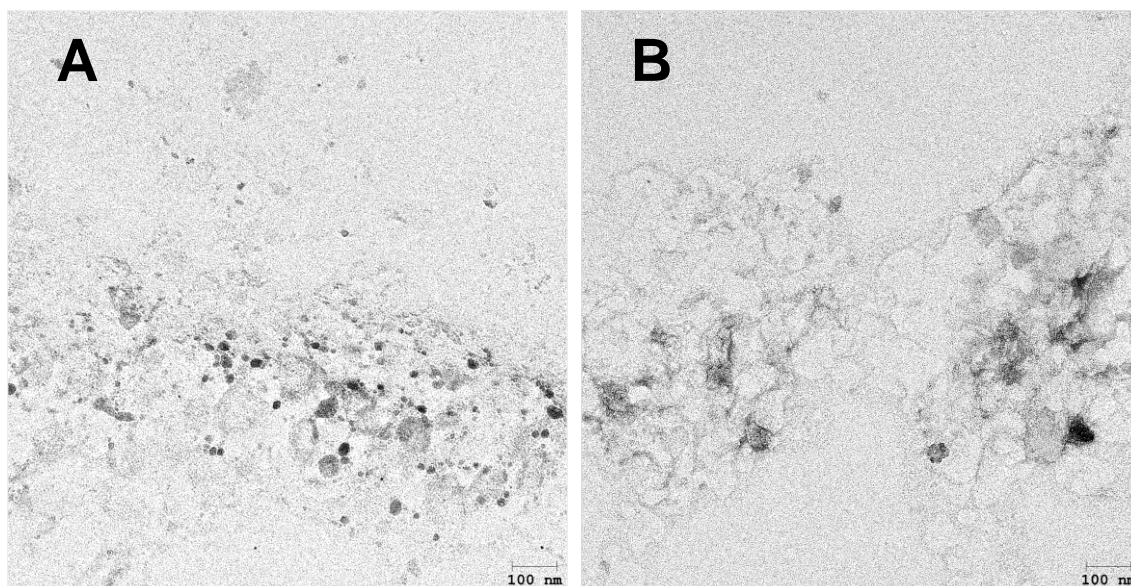


Figura 3.1.11. A: Micrografía electrónica de proteína Tau fresca purificada en bacterias. La muestra se depositó a 8 $\mu\text{g/mL}$ en la rejilla, a partir de una dilución 1/100 de la purificación original. **B:** Micrografía electrónica de la misma fracción de proteína Tau mostrada en A, pero envejecida durante 6 meses a temperatura ambiente. La concentración de Tau depositado en la rejilla es de 10 $\mu\text{g/mL}$. Barra = 100 nm.

RESULTADOS

El complejo Tau-ADN se obtuvo por dos métodos diferentes: *in vitro* e *in situ*. Por un lado, la proteína pura no agregada se incubó con ADN de timo de ternera durante 1 hora (Figura 3.1.12A). El complejo resultante, formado en disolución, recuerda a una especie de collar donde los hilos de la doble hélice de ADN envuelven pequeños oligómeros circulares de Tau. Por otra parte, purificamos una nueva muestra de Tau en *E.coli*, omitiendo esta vez las etapas en las que se elimina ADN. De esta forma conseguimos un complejo producido de forma endógena por la bacteria y en un medio fisiológico. Como muestra la Figura 3.1.12B, este complejo es muy similar al que se formó *in vitro*, y se presta de nuevo a establecer un cierto paralelismo con la estructura del complejo ADN-histona: en el caso de los nucleosomas, los octámeros de histonas forman una especie de collar de cuentas al enredarse en el ADN, que es una estructura parecida a la observada en el complejo ADN-Tau, con pequeños oligómeros circulares de Tau unidos a largos hilos de ADN.

En la Figura 3.1.13A se observa un control del ADN de timo de ternera usado en el complejo de la Figura 3.1.12A. Este ADN fue tratado previamente por la casa comercial con ADNasa I, fragmentándolo en trozos de varios miles de pares de bases.

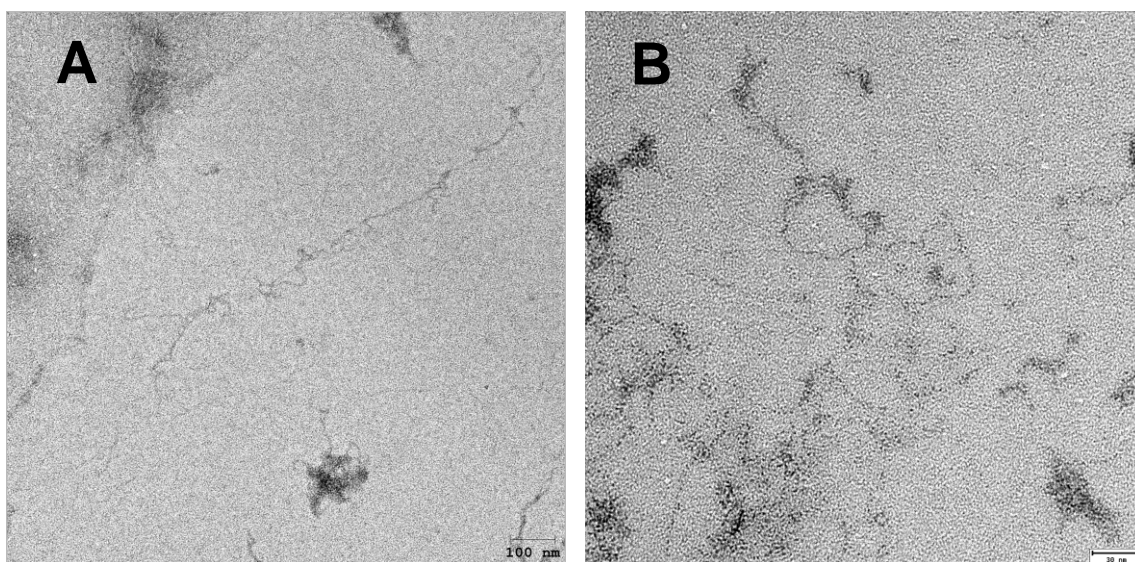


Figura 3.1.12: **A:** Micrografía electrónica del complejo Tau-ADN preparado a partir de ADN de timo de ternera (8 $\mu\text{g/mL}$) y proteína Tau (8 $\mu\text{g/mL}$) de la misma fracción utilizada en la Figura 3.1.11A. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. **B:** Complejo Tau-ADN obtenido *in situ* en *E.coli*, en presencia de ADN bacteriano. Utilizamos una dilución 1/100 de la muestra original. Barra = 30 nm.

La mezcla de histonas preparada en los ensayos de fusión (tipo II-A, Sigma) también se mezcló con este ADN de timo de ternera, y el complejo resultante, comparable al de Tau-ADN descrito anteriormente, se expone en la Figura 3.1.13B.

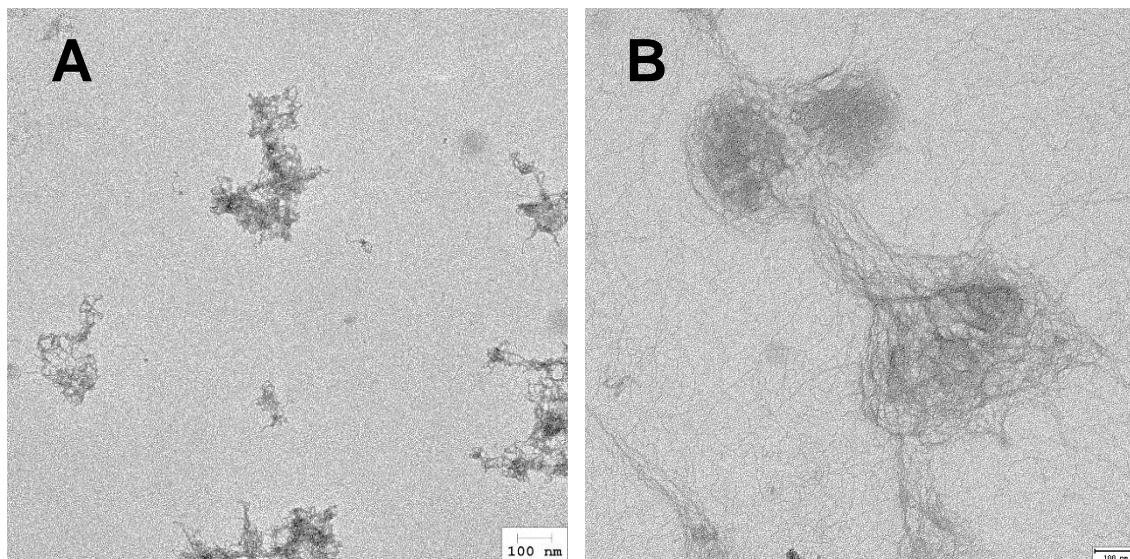


Figura 3.1.13. A: Control de ADN de timo de ternera de doble cadena (Sigma) a 8 $\mu\text{g/mL}$. **B:** Complejo ADN-histona preparado con el mismo ADN mostrado en **A** (8 $\mu\text{g/mL}$, Sigma), incubándolo con una mezcla de histonas no fraccionada (8 $\mu\text{g/mL}$, Sigma) durante 2 horas a temperatura ambiente. Barra = 100 nm.

3.1.5 Interacción de Tau con oligonucleótidos

Hasta ahora no hemos prestado atención a la secuencia de los ácidos nucleicos implicados en los ensayos de interacción, utilizando un ADN genérico fragmentado en diferentes tamaños. Los oligonucleótidos, sintetizados como pequeñas cadenas complementarias independientes, ofrecen un amplio abanico de posibilidades para determinar si existe especificidad por algún tipo de secuencia en la interacción Tau-ADN. Nosotros elegimos como modelo un tamaño de 20 pares de bases, que es lo suficientemente largo para formar una estructura ordenada y lo suficientemente pequeño para aportar información sobre la afinidad de la proteína Tau por pequeños dominios o elementos del ADN. En el ensayo descrito en la Figura 3.1.14, usamos dos secuencias distintas. Una de ellas, se encuentra antes del inicio del gen de GSK3 β , y contiene un decámero central que presenta un 80% de homología con la secuencia

RESULTADOS

GGATTGGGGT. Se ha descrito recientemente que la unión de péptido amiloide a modo de factor de transcripción sobre este elemento, induce un aumento en los niveles de la proteína p53, lo que provoca finalmente muerte celular. Por otro lado, usamos un control negativo, una secuencia de 20 pares de bases que se encuentra antes del inicio del gen APPHSE, y que únicamente presenta una homología del 40% con al elemento citado. La electroforesis en gel de agarosa se usó como herramienta para comprobar si la proteína Tau muestra mayor o menor afinidad por alguna de estas secuencias. El patrón de retención de los oligonucleótidos de doble hebra GSK3 β y APPHSE en presencia de Tau es muy similar, a la vista de los carriles 1 y 5 de la Figura 3.1.14. Por tanto, este resultado apoya la hipótesis de que la interacción Tau-ADN es independiente de secuencia. Los carriles 3 y 7 muestran el retardo del complejo ADN-histona, que es comparable al del complejo ADN-Tau. No se observan bandas en la parte superior del gel en ningún caso, lo que indica que los agregados formados en todos los casos tienen tamaños similares.

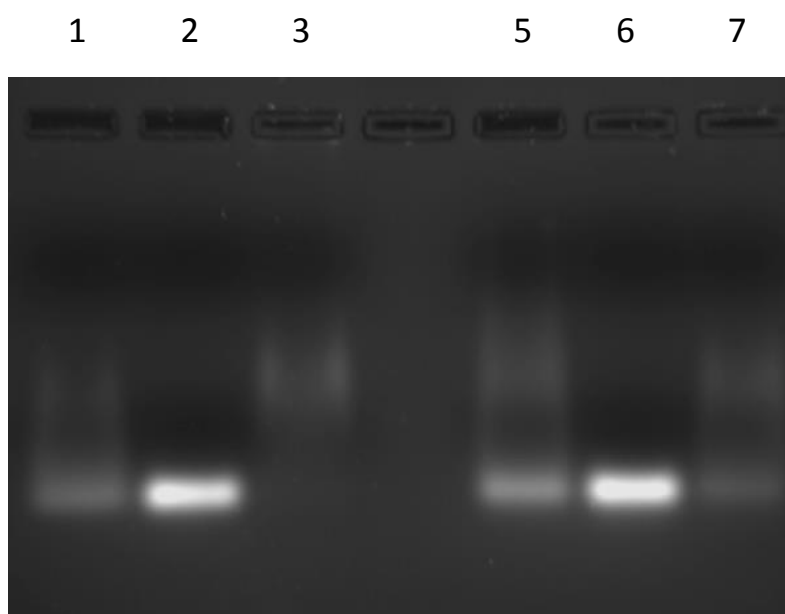


Figura 3.1.14: Ensayos de retardo en gel de agarosa al 2% (w/v) de oligonucleótidos doble hebra. Carril 1: GSK3 β incubado con Tau a una relación en masa 1:5. Carril 2: Oligo control GSK3 β (0.5 μ g). Carril 3: GSK3 β incubado con histonas a una relación en masa 1:5. Los carriles 5, 6 y 7 contienen las mismas relaciones de proteína-ADN, sustituyendo el oligo GSK3 β por APPHSE. Los complejos oligo-proteína se incubaron a temperatura ambiente 1 hora antes de ser resueltos en la electroforesis. Se aplicó un voltaje de 80 V durante 45 minutos en tampón TAE 1X. Los oligonucleótidos se tiñeron añadiendo SYBR Green.

En estos ensayos de retardo las cadenas sentido y antisentido de GSK3 β y APPHSE, que fueron sintetizadas por separado (Sigma-Aldrich, USA), se hibridaron durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de ser incubadas con Tau o histonas. Una de las ventajas de trabajar con este tipo de oligonucleótidos es que también pueden usarse como modelo de hebras simples no hibridadas. Por tanto, podemos estudiar si la proteína Tau interacciona únicamente con la doble hélice de ADN o si por el contrario, puede unirse además a una sola cadena.

La resonancia de plasmón superficial nos aporta información en tiempo real sobre los procesos que tienen lugar en la superficie del sensor. Si unimos una de las hebras de un oligo sobre la superficie y a continuación introducimos la cadena complementaria en flujo, es posible ver la hibridación en tiempo real, como indica la Figura 3.1.15. Puesto que las dos cadenas quedan unidas a través de enlaces de hidrógeno entre sus bases nitrogenadas, los grupos fosfato de la segunda cadena quedarían expuestos. A la vista de nuestros resultados la proteína Tau puede unirse a esta zona de la cadena, que presenta una elevada densidad de carga negativa.

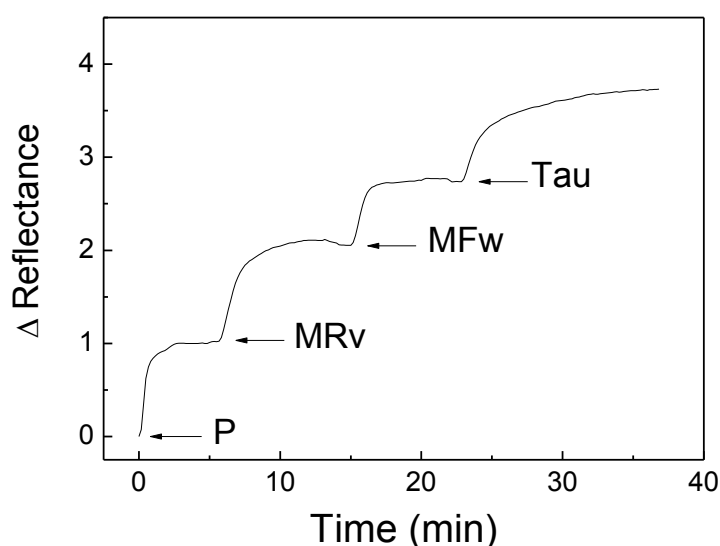


Figura 3.1.15: Unión de la proteína Tau a una sola hebra de ADN hibridado en la superficie del sensor. Usamos una secuencia de 20 bases (llamada MAPK14 en Materiales y métodos). La cadena antisentido o *reverse* (MRv) se añade a 0.6 μ M sobre una monocapa de polilisina 40 μ g/mL (P). A continuación circuló, a 0.6 μ M, la cadena sentido o *forward* (MFw) hibridando a temperatura ambiente con la cadena anterior. La proteína Tau se añadió a 10 μ g/mL sobre la cadena *forward*, que quedó expuesta tras la hibridación.

RESULTADOS

Este experimento se repitió con oligonucleótidos de secuencias diferentes, obteniendo el mismo resultado. Por tanto, podemos concluir que la proteína Tau se une al ADN de un modo independiente de secuencia, lo cual está de acuerdo con trabajos anteriores (Villasante et al., 1981). Una vez que hemos demostrado que la proteína Tau puede interaccionar tanto con ADN de cadena doble, como con la hebra sencilla de un oligonucleótido, es preciso preguntarse si al menos existe alguna zona concreta del ADN donde la proteína se une de forma mayoritaria.

Durante los últimos años se ha prestado especial atención a una región de la doble hélice que se conoce como el surco menor o *minor groove*, donde se unen multitud de proteínas entre ellas la histona, para realizar funciones reguladoras. La distamicina A, se ha usado repetidamente en terapias contra el cáncer como un inhibidor de la proliferación celular que compite con estas proteínas por la unión al surco menor del ADN. Por tanto, si es cierto que la proteína Tau se une al surco menor de la doble hélice, deberíamos observar cierto bloqueo de la unión en presencia de distamicina A. En primer lugar llevamos a cabo un control de unión de Tau sobre ADN de doble cadena, inmovilizado previamente sobre la superficie del sensor (Figura 3.1.16). Vimos que esta unión genera un espesor que es del orden de una polilisina.

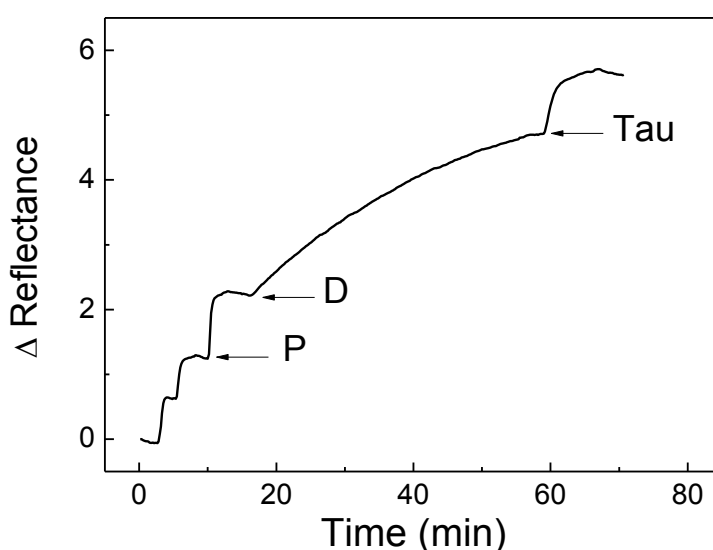


Figura 3.1.16: Control de unión de Tau a la doble hélice de ADN. Se inmovilizó ADN de timo de ternera (D) a 8 μ g/mL sobre la estructura de tipo PHP (polilisina-heparina-polilisina). A continuación se inyectó en flujo la proteína Tau a 10 μ g/mL en el tampón habitual HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.

Sin embargo, la incubación con distamicina A redujo en algo más del 50% el espesor de Tau unido a ADN (Figura 3.1.18). En este ensayo, después de inmovilizar ADN, circulamos distamicina A 125 μM antes y durante la unión de Tau (Figura 3.1.17). Es importante destacar que la distamicina A no bloqueó totalmente la unión de Tau a la doble hélice, lo que sugiere que la interacción Tau-ADN no sólo está mediada por el *minor groove*. Tau podría unirse a los grupos fosfato, como vimos anteriormente.

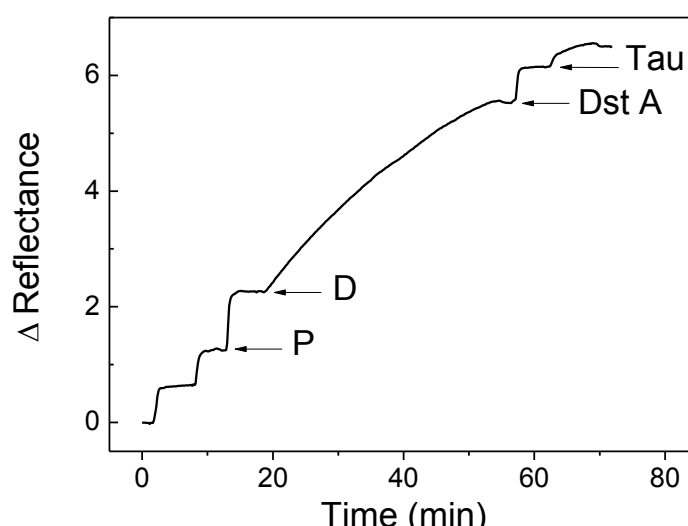


Figura 3.1.17: Unión de proteína Tau a la doble hélice de ADN en presencia de distamicina A 125 μM

Se inmovilizó ADN de timo de ternera a 8 $\mu\text{g/mL}$ (D) sobre PHP. La concentración de distamicina A se estimó midiendo su absorbancia a 303 nm ($\epsilon = 34000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Tras circular distamicina A durante 5 minutos, circuló Tau a 10 $\mu\text{g/mL}$ en tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM y distamicina A 125 μM (Dst A).

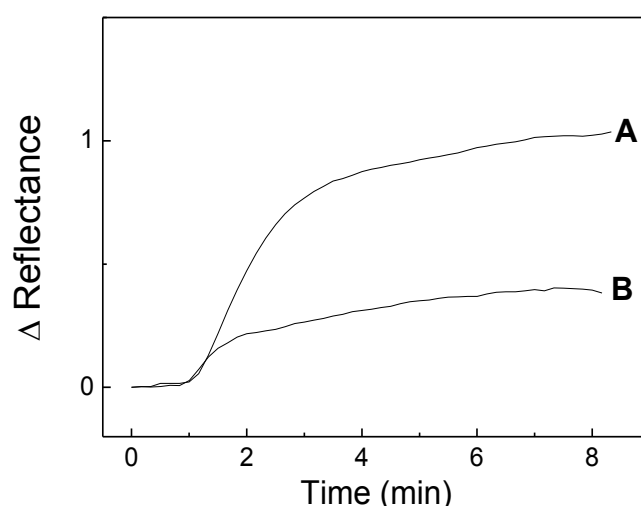


Figura 3.1.18: Zoom de la unión de Tau a ADN en ausencia (A) o en presencia (B) de distamicina A

La reflectancia se estandarizó dividiendo por el valor de la polilisina a la que se une el ADN en cada caso.

Los surcos o hendiduras que presenta la doble hélice de ADN resultan de la organización de los pares de bases en una estructura ordenada y periódica. La estructura secundaria de una sola cadena de ADN, tanto en disolución como en superficie, es totalmente aleatoria, y por lo tanto carece de surcos o estructuras características. En la Figura 3.1.19 se comprobó que la proteína Tau puede unirse incluso a esta superficie, si bien el espesor de proteína unida quedó reducido a la mitad del espesor observado sobre la doble hélice.

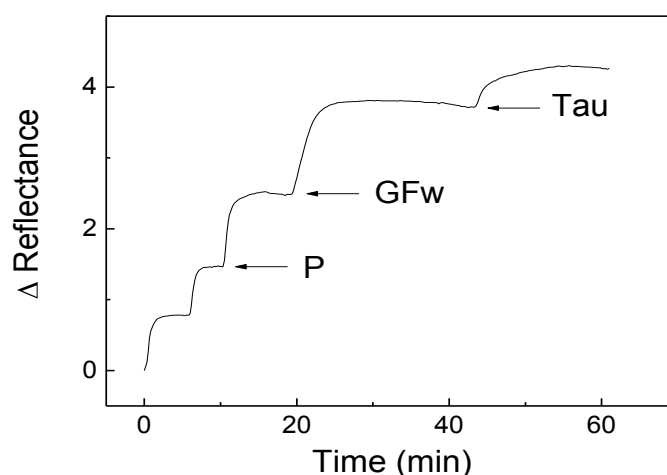


Figura 3.1.19: Control de unión de Tau a la cadena sencilla de un oligonucleótido de 20 pares de bases. Una vez inmovilizada la cadena sentido de GSK3 β (GFw) a 0.6 μ M sobre PHP (polilisina-heparina-polilisina), circulamos la proteína Tau a 10 μ g/mL en tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.

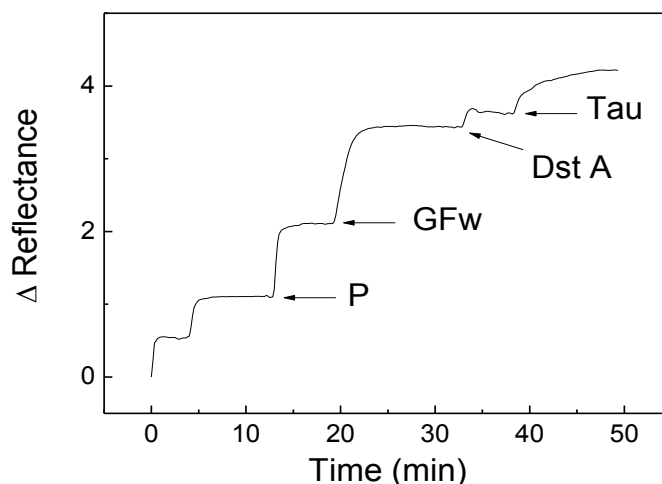


Figura 3.1.20: Unión de Tau a la cadena sencilla del oligonucleótido en presencia de distamicina A Inmovilizamos la cadena sentido de GSK3 β a 0.6 μ M sobre PHP. Durante 5 minutos circuló distamicina A y después se inyectó Tau a 10 μ g/mL en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM y distamicina A 125 μ M (Dst A).

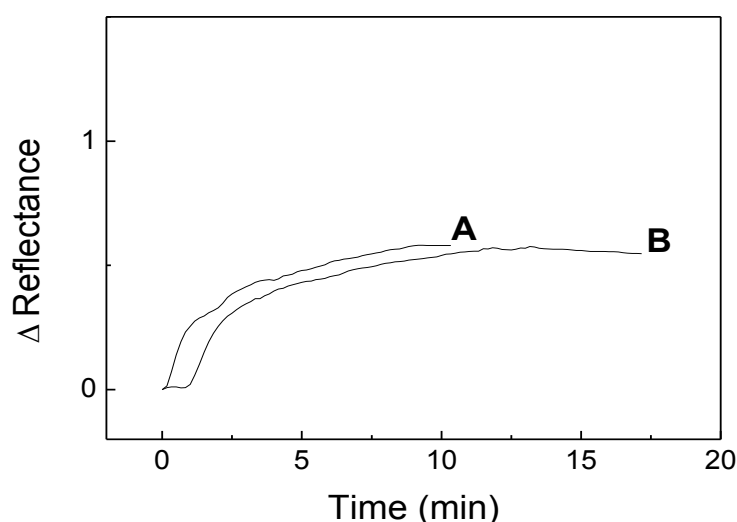


Figura 3.1.21: Zoom de la unión de Tau a ADN de cadena sencilla en ausencia (B) o en presencia (A) de distamicina A. El eje Y está referido al valor de reflectancia que alcanzó la polilisina en cada ensayo.

La unión de Tau a oligonucleótidos de cadena única no se vio afectada por la presencia de distamicina A, a la vista de las Figuras 3.1.20 y 3.1.21. Este resultado tiene sentido, puesto que la unión de Tau a sitios independientes de los surcos del ADN no puede ser bloqueada por la distamicina A, que interacciona específicamente con el surco menor de la doble hélice. De hecho, se puede apreciar que la unión de distamicina A sobre la cadena sencilla del oligo es débil (Figura 3.1.20), prácticamente residual en comparación con el espesor que genera al unirse a la doble hélice de ADN (Figura 3.1.17). En cualquier caso, la presencia de distamicina A se aseguró durante todo el ensayo, ya que también fue añadida a la disolución de proteína Tau.

Taken all together, los resultados confirman que la proteína Tau no sólo interacciona a través del surco menor con la doble hélice de ADN, sino que también se une a elementos adicionales como los grupos fosfato, presentes tanto en pequeños oligonucleótidos de cadena simple (hibridados y no hibridados) como en polinucleótidos de cadena doble.

3.2 Interacción A β -ADN

3.2.1 Estudio de interacciones entre ADN y péptidos A β por espectroscopía de resonancia Raman ultravioleta

Los péptidos β -amiloides presentan una elevada tendencia a la agregación, lo que dificulta el uso de ciertas técnicas como la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear en el estudio de su estructura e interacciones. En cambio, técnicas ópticas como la espectroscopía de resonancia Raman ultravioleta permiten monitorizar moléculas en disolución con independencia de su estado de agregación. Como primer paso en el estudio de la interacción entre el ADN y los amiloides, registramos los espectros Raman de los péptidos A β_{25-40} y A β_{1-40} , que fueron purificados previamente en el laboratorio de la doctora Renee JiJi, en la Universidad de Missouri-Columbia. A continuación, mezclamos estos péptidos con ADN para identificar posibles cambios de estructura que podrían ocurrir cuando la doble hélice de ADN entra en contacto con especies solubles de β -amiloide.

El espectro Raman de cualquier péptido o proteína puede dividirse en cuatro regiones: las bandas amida III (1200-1300 cm⁻¹), amida S (1300-1425 cm⁻¹), amida II (1450-1580 cm⁻¹) y amida I (1600-1690), que resultan de los diferentes modos de vibración del grupo amida presente en el enlace peptídico. Excitamos las muestras con radiación UV de $\lambda = 197$ nm, que es absorbida por dicho enlace dando lugar a un espectro con una buena relación señal/ruido, incluso en muestras poco concentradas. A β_{25-40} contiene la secuencia *GSNKGAIIGLMVGGVV* que carece de aminoácidos aromáticos y posee cierto carácter hidrofóbico al presentar únicamente la carga positiva de la lisina. Tiende a adoptar una mezcla de conformaciones, entre las que destaca la estructura de poliprolina tipo II (PPII). Esta estructura desordenada, que se ha observado en la poliprolina y en otras proteínas desplegadas, se encuentra a medio camino entre la conformación de cadena aleatoria o *random coil* y la de α -hélice. El espectro obtenido para A β_{25-40} con sus picos característicos se muestra en la Figura 3.2.1. Tanto el número de bandas como las posiciones en las que aparecen, coinciden con publicaciones anteriores (Wang & JiJi, 2011).

La banda amida III del espectro consta de tres picos centrados en 1250, 1292 y 1315 cm^{-1} asignables a la conformación PPII (Mikhonin et al., 2005). La banda amida S con centro en 1388 cm^{-1} podría atribuirse a una estructura desordenada, al igual que la banda amida II, con un máximo en 1557 cm^{-1} (Wang & JiJi, 2011).

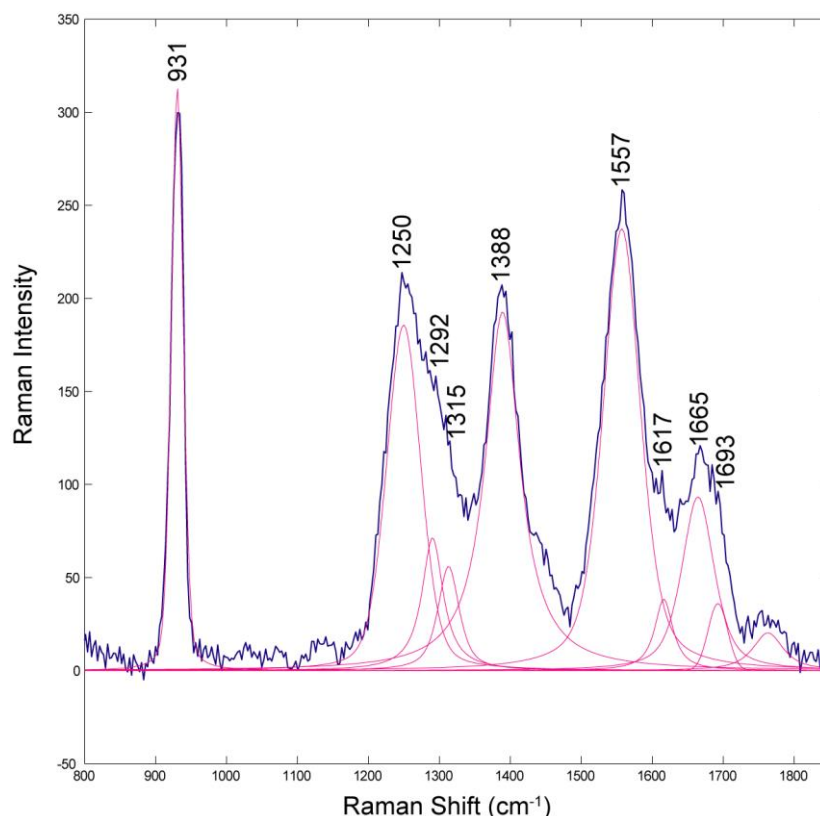


Figura 3.2.1: Espectro UV Raman de $A\beta_{25-40}$ 60 μM sonificado en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.4 y NaClO_4 50 mM, excitando a una longitud de onda de 197 nm. El ajuste de los picos se muestra en rosa.

Por último, la banda amida I presenta un pico predominante en 1665 cm^{-1} , que coincide con el valor asignado a la estructura PPII (Oladepo et al., 2012). Una vez identificadas las bandas del péptido, registramos su espectro en presencia de ADN a dos concentraciones diferentes de este último: 0.02 y 0.1 mg/mL. Dado que la longitud de onda de excitación es muy próxima a 200 nm, las bases del ADN absorben débilmente la radiación y tan sólo será posible ver su contribución en el espectro a una concentración elevada de ADN. La incubación de $A\beta_{25-40}$ 60 μM con ADN 0.02 mg/mL permite ver cambios en la estructura del péptido pero no en el ADN (Figura 3.2.2).

Para los ensayos de interacción usamos una muestra de ADN comercial ultrapuro de doble cadena (Invitrogen) cortado en tamaños inferiores a 2000 pb. Al añadir ADN a baja concentración se observa un descenso de intensidad generalizado salvo en la zona de amida I. Los cambios en la intensidad de amida I y amida II en sentidos opuestos, aumento y descenso respectivamente, pueden estar relacionados con la deshidratación del esqueleto peptídico (Xu et al., 2007; Popova et al., 2010).

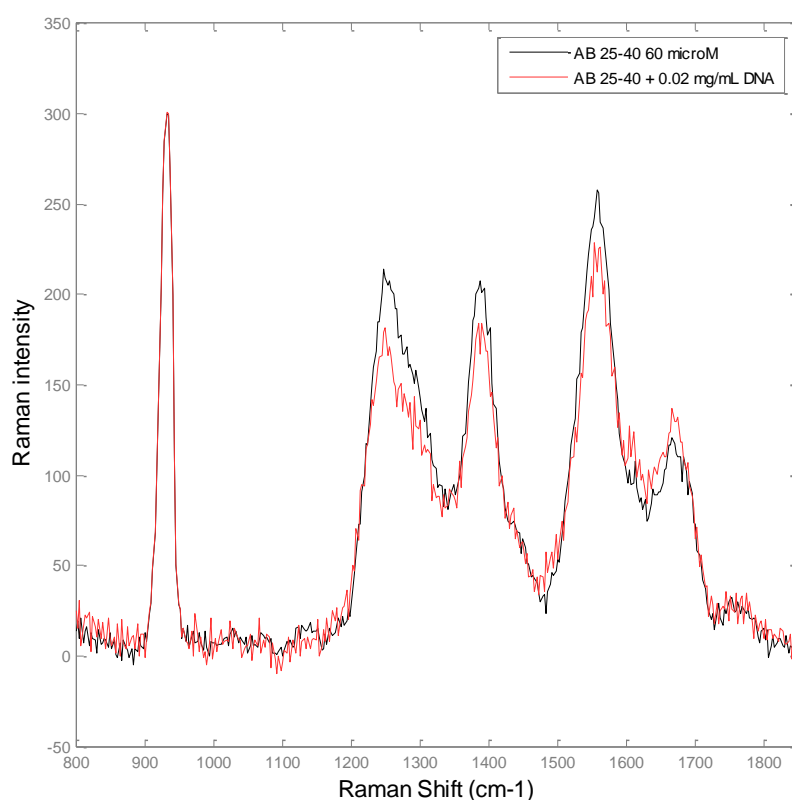


Figura 3.2.2: Incubación de ADN a baja concentración y $A\beta_{25-40}$ (línea roja) frente a $A\beta_{25-40}$ (línea negra). Se utilizó la misma preparación de péptido disuelto a 60 μM para la incubación de 4 horas con ADN.

La deshidratación conlleva la liberación de moléculas de agua, lo cual puede ser consecuencia de interacciones hidrofóbicas entre ADN y péptido amiloide. No obstante, también es posible que la deshidratación derive de un proceso de agregación del péptido inducido por ADN. En ese caso, no podría descartarse que la agregación de $A\beta_{25-40}$ y la interacción con ADN ocurrieran simultáneamente. Cuando elevamos la concentración de ADN a 0.1 mg/mL registramos también la intensidad Raman de las bases, que se mezcla con las bandas amida del péptido (ver

Figura 3.2.3). En esta figura comparamos el espectro de la mezcla con la suma teórica del péptido y ADN. Los picos situados en 1250 y 1292 cm^{-1} muestran cambios leves en la estructura secundaria del péptido y observamos nuevos picos donde predomina la contribución del ADN. Los modos de vibración de las bases purínicas, adenina y guanina, se encuentran en 1335, 1419, 1487, 1577 y 1646 cm^{-1} (Neugebauer et al., 2007). Es posible apreciar ciertos cambios en todos los picos salvo en el de 1490 cm^{-1} .

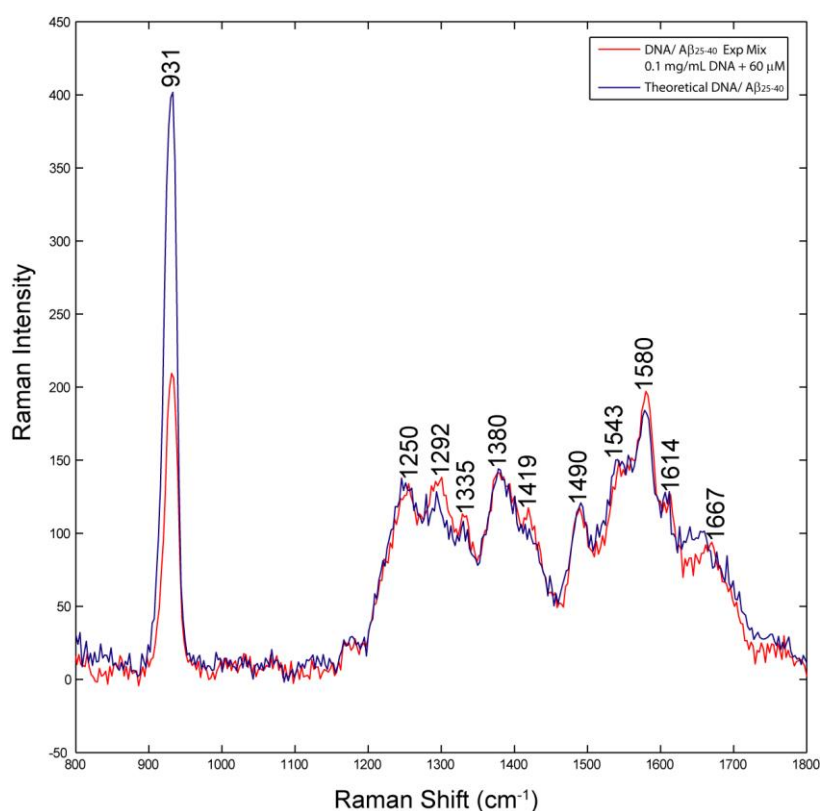


Figura 3.2.3: Incubación de ADN 0.1 mg/mL con $A\beta_{25-40}$ 60 μM durante 4h (línea roja) frente a la suma teórica de $A\beta_{25-40}$ y ADN (línea azul). Todos los ensayos se realizaron a igual pH y fuerza iónica.

Estos cambios de intensidad derivan de la interacción entre el péptido y ADN. El descenso de intensidad más pronunciado respecto a la suma teórica se observa en el pico de 1646 cm^{-1} , que además sufre un desplazamiento hacia 1667 cm^{-1} . Este valor prácticamente coincide con el del máximo que presenta el espectro control de $A\beta_{25-40}$ en la región amida I (Figura 3.2.1). Por tanto, cabe pensar que estamos viendo únicamente la señal del péptido como consecuencia de un descenso de intensidad en

el pico de 1646 cm^{-1} del ADN. La Figura 3.2.4 apoya esta hipótesis. En esta figura se compara el espectro control de ADN con el de la incubación ADN/ $A\beta_{25-40}$. El espectro de $A\beta_{25-40}$ se ha sustraído a la mezcla con objeto de ver solamente los cambios inducidos en el ADN. En la figura se aprecia un descenso de intensidad especialmente significativo en las bandas más intensas, como las centradas en 1583, 1606 y 1646 cm^{-1} , todas ellas pertenecientes a modos de vibración de las bases del ADN. Además, vemos cambios en los picos característicos del amiloide como 1250 cm^{-1} . En resumen, el ADN induciría cambios en $A\beta_{25-40}$ y a su vez, este péptido, contenido dentro de la secuencia de $A\beta_{1-40}$, interaccionaría con ADN a través de sus bases. Para estudiar si la interacción se ciñe a estos 16 aminoácidos en concreto o puede ocurrir también con secuencias más largas, llevamos a cabo ensayos similares con el péptido $A\beta_{1-40}$.

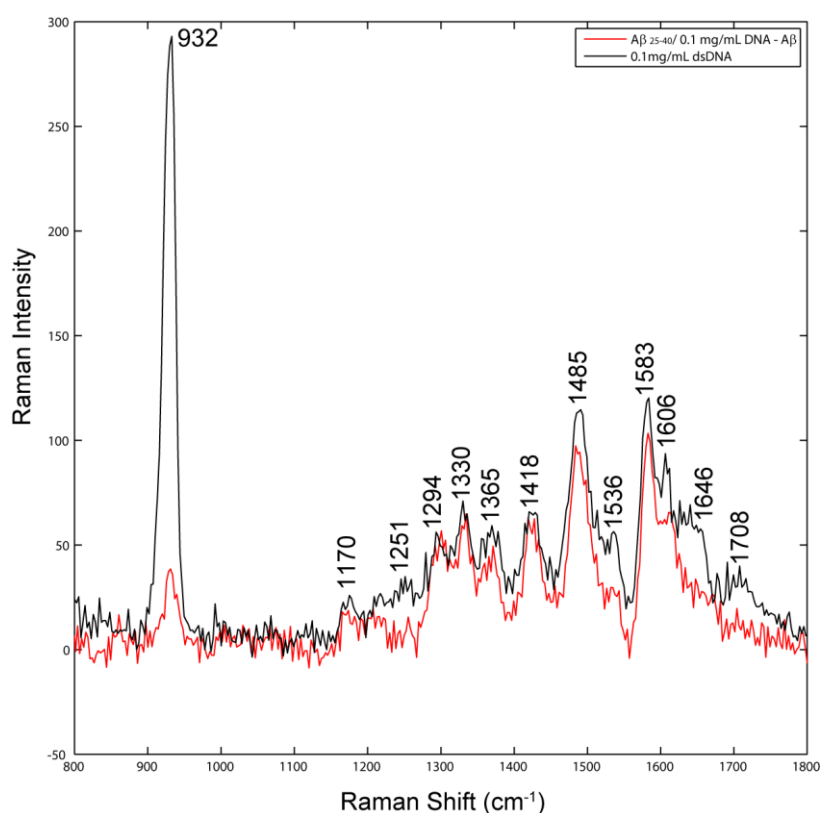


Figura 3.2.4: Espectro de ADN doble hebra a 0.1 mg/mL en tampón fosfato 10 mM y $\text{NaClO}_4\text{ }50\text{ mM}$ (línea negra) comparado con la diferencia entre el espectro control de $A\beta_{25-40}$ (Figura 3.2.1) y el espectro de la mezcla ADN $0.1\text{ mg/mL}/A\beta_{25-40}$ (línea roja). Los ensayos se realizaron a igual pH y fuerza iónica.

El péptido $A\beta_{1-40}$ contiene 3 fenilalaninas y una tirosina. Estos aminoácidos aromáticos son sensibles a la polaridad del medio que les rodea y sus modos de vibración aparecen en el espectro Raman (Figura 3.2.5). Junto al pico de intensidad del $NaClO_4$ (931 cm^{-1}) se encuentran dos picos pertenecientes a fenilalanina. Por otra parte, los picos centrados en 1205 y 1612 cm^{-1} se deben a combinaciones de los modos de vibración de tirosina y fenilalanina (Austin et al., 1993). Si examinamos la banda amida III, encontramos de nuevo 3 picos con posiciones muy próximas a las descritas en el espectro de $A\beta_{25-40}$ lo que sugiere una estructura secundaria con elevado porcentaje de conformación PPII. Las bandas amida S y amida II con centros en 1389 y 1558 cm^{-1} están asociadas a estructuras desordenadas y coinciden con las bandas de $A\beta_{25-40}$. Sin embargo, la banda amida I se ajusta esta vez a un solo pico centrado en 1674 cm^{-1} , que señala la presencia de β -lámina antiparalela en equilibrio con la conformación PPII (Mikhonin et al., 2005).

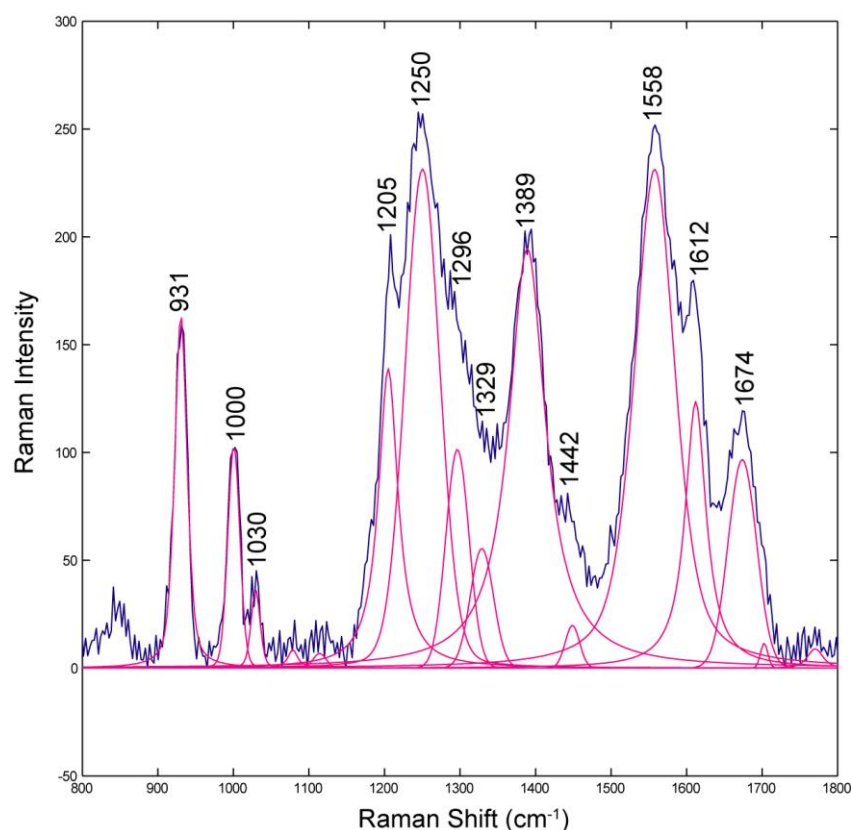


Figura 3.2.5: Espectro UV Raman de $A\beta_{1-40}$ $60\text{ }\mu\text{M}$ sonificado en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.4 con $NaClO_4$ 50 mM , excitando a una longitud de onda de 197 nm . El ajuste de los picos se muestra en rosa.

Este resultado indica que, a pesar de haber sonificado el péptido, existe cierta proporción de oligómeros que establecen enlaces de hidrógeno dando lugar a una estructura ordenada. La conversión de oligómeros de $A\beta_{1-40}$ en láminas β antiparalelas, como paso previo a la formación de fibras, se ha observado también por espectroscopía infrarroja (Sarroukh et al., 2010). Incubamos esta muestra de $A\beta_{1-40}$ 60 μ M en presencia de ADN 0.02 mg/mL para estudiar la posible interacción entre ambos. Como se puede ver en la Figura 3.2.6, el espectro del péptido amiloide disminuye de intensidad como resultado de la incubación con ADN. En este caso la disminución afecta tanto a las bandas amida III, amida S (en menor medida), amida II y amida I como a las bandas de los aminoácidos aromáticos. Dado que no observamos aumento en amida I, resulta difícil correlacionar la disminución generalizada de intensidad con un proceso de deshidratación. No obstante, los espectros sugieren que $A\beta_{1-40}$ y ADN interaccionan, y por tanto, $A\beta_{25-40}$ no es el único péptido que interacciona con ADN.

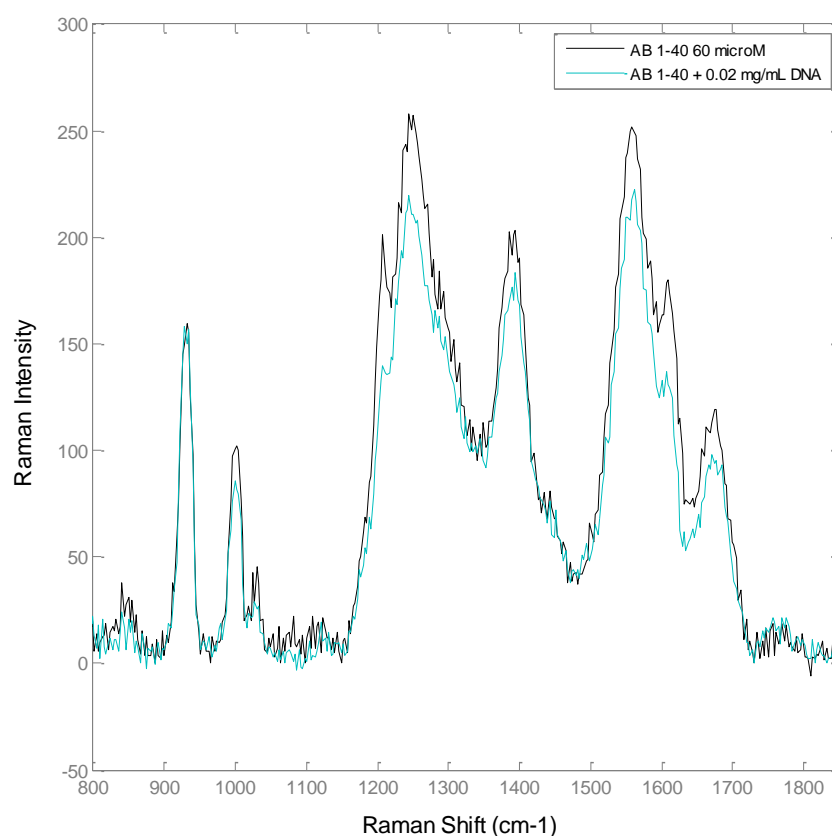


Figura 3.2.6: Incubación de ADN a 0.02 mg/mL con $A\beta_{1-40}$ (línea azul) frente a $A\beta_{1-40}$ (línea negra) Se utilizó la misma preparación de péptido, disuelto a 60 μ M, para la incubación con ADN durante 4 horas.

3.2.2 Interacción de ADN con proteínas y péptidos amiloides estudiada por RPS

Los péptidos amiloides utilizados para los espectros Raman fueron sonicados previamente para romper cualquier clase de agregado, ya que nuestro principal objetivo era estudiar los cambios que sufre el ADN en presencia de oligómeros solubles de β -amiloide. La interacción que detectamos en los espectros UVRR fue contrastada mediante resonancia de plasmón superficial. Puesto que los péptidos amiloides son extremadamente propensos a formar agregados de gran tamaño, no es fácil inmovilizarlos en superficie. Sin embargo, también existe la posibilidad de confirmar su interacción con ADN mediante ensayos de secuestro. Para poder extraer conclusiones de esta clase de ensayos es preciso que una de las dos moléculas no se una en absoluto a la superficie activada del sensor. Si esta molécula, en nuestro caso el amiloide, interacciona con su compañera, disminuirá en cierta medida el porcentaje de la misma que queda inmovilizada, secuestrándola en disolución.

Con objeto de estudiar la especificidad del secuestro de ADN por agregados de tipo amiloide, expusimos varias proteínas a un proceso de agregación a temperatura ambiente y estudiamos por RPS si los agregados son capaces de secuestrar ADN. Evitamos añadir agentes desnaturalizantes que alteraran la estructura de las proteínas artificialmente y en su lugar, dejamos que las propias proteínas fueran ordenándose para formar estructuras agregadas a lo largo de varios meses. Las micrografías electrónicas de los agregados se muestran en las Figuras 3.2.7 y 3.2.8. A la vista de las imágenes, es evidente que los agregados de las proteínas estudiadas (albúmina, β -lactoglobulina, caseína y mioglobina) tienen un aspecto de tipo esponjoso que difiere de los agregados fibrilares formados por los péptidos amiloides. Es muy significativo el hecho de que ninguna proteína formó fibras a pesar de haber envejecido durante meses. En cambio, $A\beta_{25-35}$ ya presentaba estructuras fibrosas 2 horas después de disolverse en agua. De hecho, no puede descartarse la posibilidad de que este pequeño fragmento de once aminoácidos agregue de inmediato tras entrar en contacto con el medio. Los agregados que muestra la β -lactoglobulina son los que más se aproximan a una estructura prefibrilar, aunque su longitud (del orden de 100-200 nanómetros) es muy inferior a la de las fibras de amiloide, que tanto en el caso de $A\beta_{25-35}$ como en el del péptido $A\beta_{1-40}$, llegan a alcanzar más de una micra.

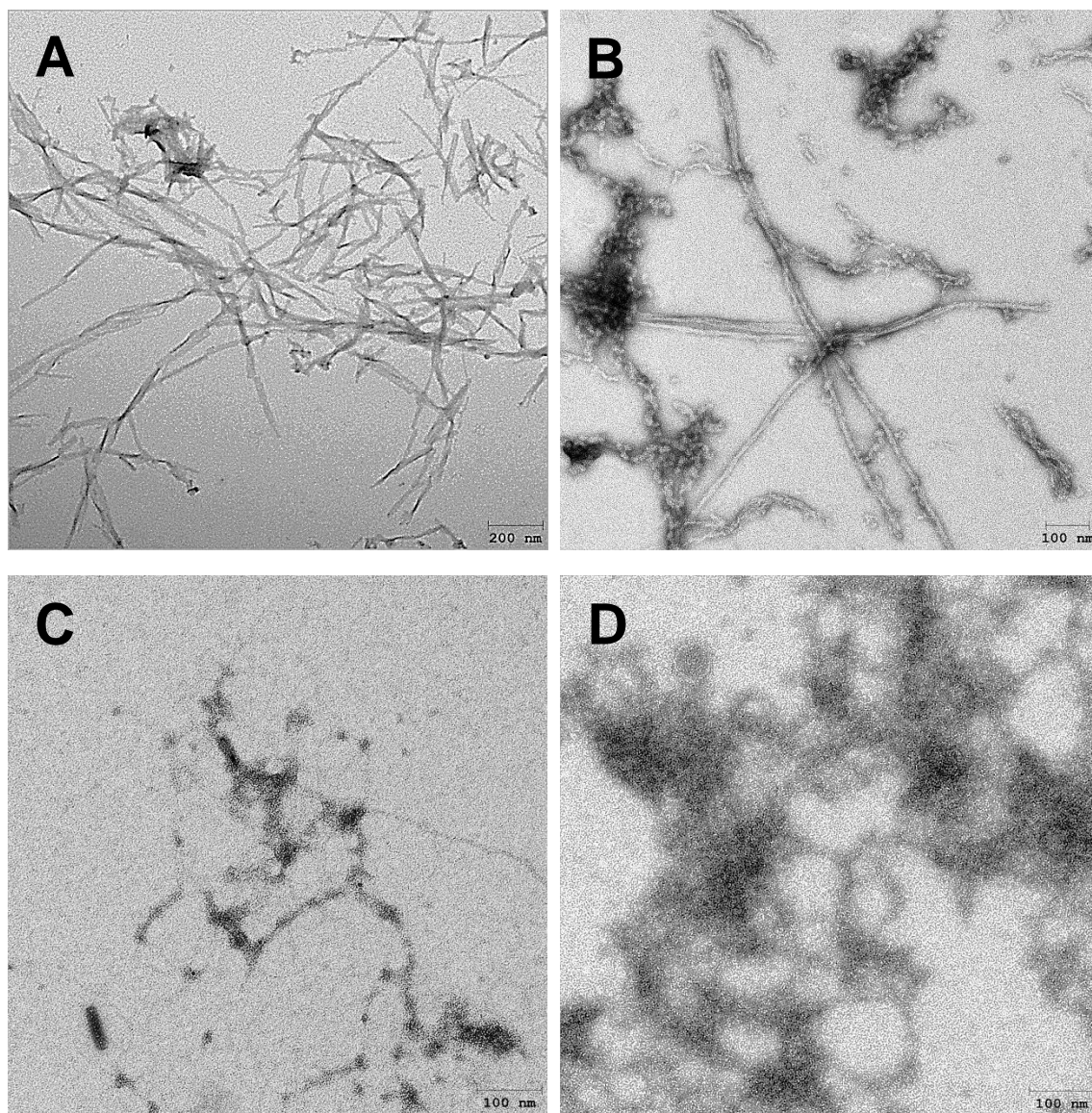


Figura 3.2.7: Micrografías electrónicas de proteínas y péptidos agregados a temperatura ambiente.

A. Péptido $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{g/mL}$) 2 horas después de disolverse en agua destilada. **B.** Péptido $A\beta_{1-40}$ (40 $\mu\text{g/mL}$) una semana después de disolverse en bicarbonato sódico 10 mM. **C.** β -lactoglobulina (0.1 mg/mL) 7 meses después de disolverse en agua destilada. **D.** Albúmina de suero bovino (0.5 mg/mL) 5 meses después de disolverse en agua destilada. Todas las muestras se tiñeron con acetato de uranilo.

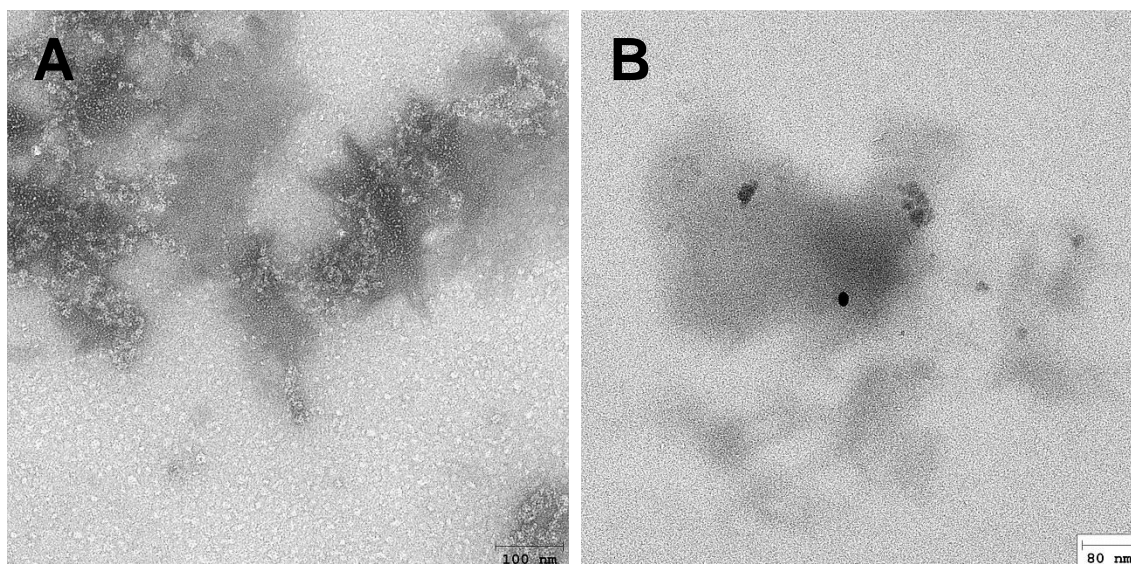


Figura 3.2.8: Micrografías electrónicas de proteínas y péptidos agregados a temperatura ambiente.

A. Mioglobina (0.5 mg/mL) 9 meses después de disolverse en agua destilada. **B.** Caseína (20 µg/mL) nueve días después de disolverse en tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7. Barra = 80 nm.

Por otra parte, los agregados de mioglobina y albúmina muestran un aspecto nebuloso poco definido, carente de estructuras fibrosas. La caseína (Figura 3.2.8B) fue preparada a una concentración muy baja puesto que su solubilidad en agua es muy baja. Tiende a formar agregados de gran tamaño difíciles de mantener en disolución, y por ello sólo fue envejecida durante algo más de una semana a temperatura ambiente. A continuación examinamos la interacción de estos agregados con ADN por RPS.

El ADN se une irreversiblemente a la polilisina, que nos sirve de anclaje para depositarlo en la superficie del sensor. El proceso de unión se ajusta a una cinética de pseudo-primer orden (Figura 3.2.9B) ya que podemos asumir que la velocidad a la que es inmovilizado en superficie depende únicamente de la concentración de ADN suministrada en flujo. Como vemos en la Figura 3.2.9A, concentraciones decrecientes de ADN conducen a inmovilizaciones más lentas. De hecho, si reducimos la concentración de ADN por debajo de 6 µg/mL (curva d), el espesor de la doble hélice inmovilizada no alcanza los 2 nanómetros. Al trabajar a baja concentración parte de la

muestra se pierde en las paredes de la bomba y no llega a depositarse en la superficie del sensor. Para evitar este problema, incubamos ADN a una concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$ con los diferentes tipos de agregados en todos los ensayos (Figura 3.2.10).

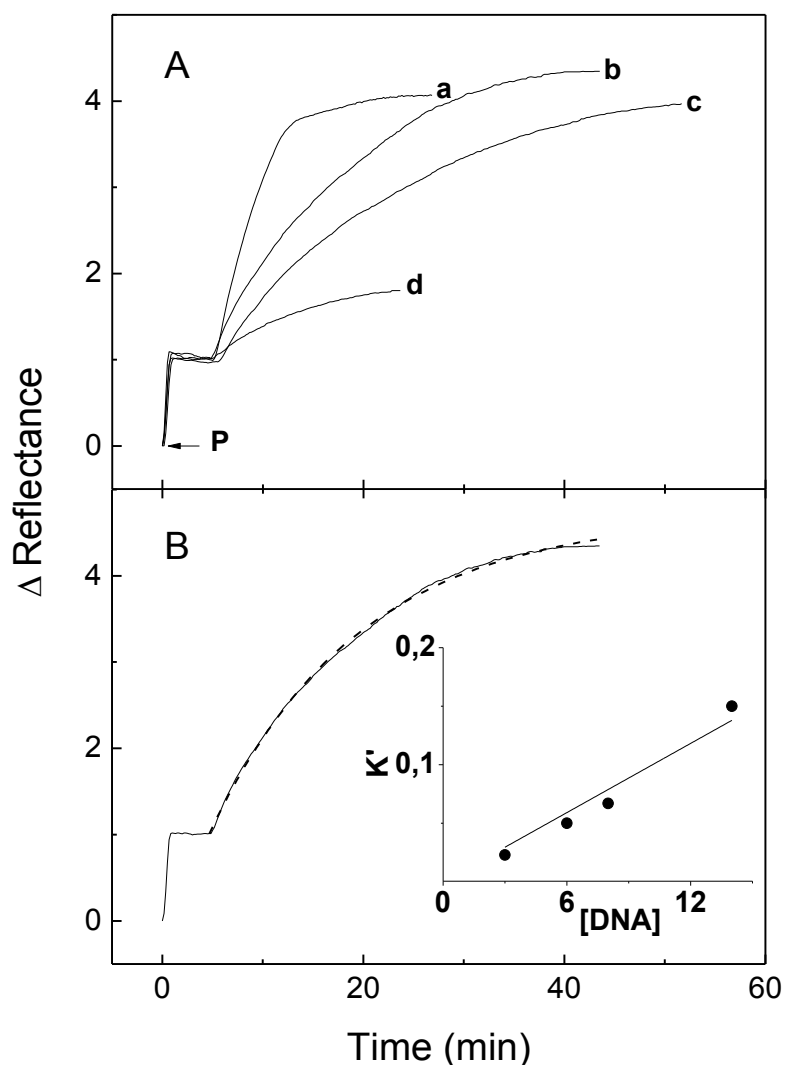


Figura 3.2.9: Inmovilización de ADN sobre la superficie del sensor activada por polilisina.

A. Las curvas a, b, c y d corresponden a concentraciones de ADN de 14, 8, 6 y 3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente sobre una monocapa de polilisina (P) a 40 $\mu\text{g/mL}$. **B.** Ajuste de la curva b (8 $\mu\text{g/mL}$) a una ecuación de pseudo-primero orden. El inset representa cómo la constante de velocidad de unión k' depende linealmente de la concentración de ADN. El eje de ordenadas de las gráficas A y B indica los incrementos de reflectancia referidos a la polilisina, que genera un espesor aproximado de 1 nm. Todos los ensayos de RPS descritos en la sección de resultados se realizaron en tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.

RESULTADOS

La siguiente figura recoge los ensayos de interacción con las proteínas agregadas (curvas a), frente al control de unión del ADN (curvas b). Se puede ver que las proteínas agregadas perdieron la capacidad de unirse a la superficie de polilisina (curvas c). No obstante, ninguna de ellas secuestró ADN, que queda inmovilizado sobre la superficie alcanzando prácticamente el mismo espesor que la curva control. Dichos resultados indican que estos agregados no interaccionan con ADN.

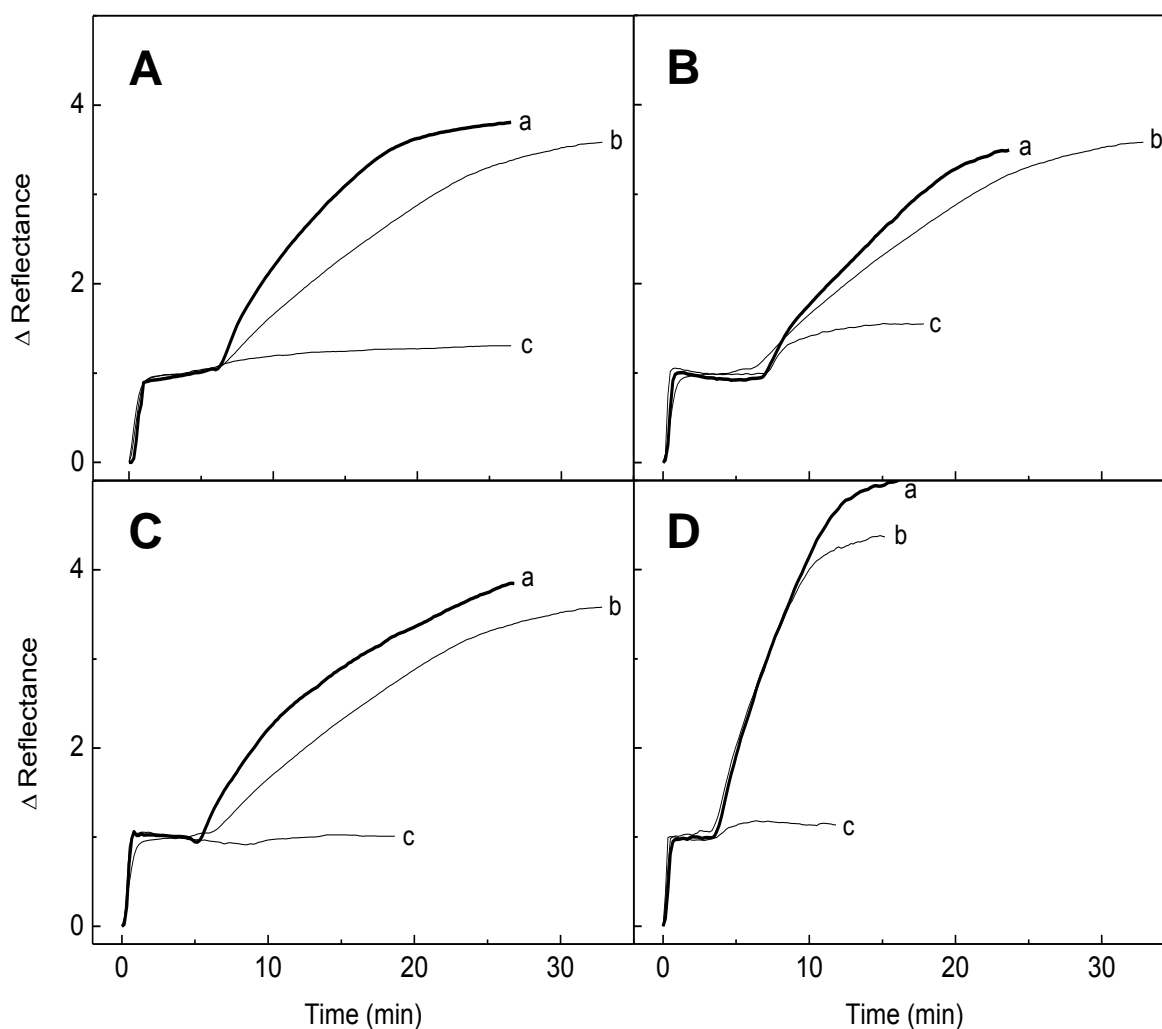


Figura 3.2.10: Ensayos de RPS con ADN y proteínas envejecidas. **A.** β -Lactoglobulina de 9 meses, **B.** BSA de 5 meses, **C.** Mioglobina de 9 meses, **D.** Caseína de 7 días. Las curvas **a** representan la mezcla de proteína agregada (20 $\mu\text{g/mL}$) y ADN de timo de ternera (8 $\mu\text{g/mL}$) incubada 1 h a RT. Todas las proteínas agregadas (curvas c) envejecieron a temperatura ambiente. Las curvas **b** son controles de unión de ADN (8 $\mu\text{g/mL}$) a la superficie de polilisina, realizados el mismo día que los otros dos ensayos.

Por otra parte, es bien conocido que las histonas forman un complejo con ADN que es la base de la cromatina presente en el núcleo eucariota. Cabe preguntarse si es imprescindible que la proteína mantenga su estructura nativa para que tenga lugar la interacción ADN-histona, o si el ADN podría unirse incluso a la histona agregada. Para simplificar el ensayo, en esta ocasión, en vez de trabajar con la mezcla completa de histonas (no fraccionada) ensayamos la unión a ADN con la fracción de histona 1. Usamos una preparación comercial de histona de timo de ternera conocida como Tipo III-S (Sigma, St. Louis, USA) que contiene esencialmente la histona H1, aquella que actúa como nexo de unión entre cada nucleosoma y el ADN *linker* o conector. Esta fracción, que contiene una gran proporción de aminoácidos con carga positiva (principalmente lisinas), formó fibras de gran tamaño con el paso de los meses (Figura 3.2.11A). Este agregado de tipo fibroso no se unió a la superficie de polilisina y secuestró parcialmente al ADN (Figura 3.2.11B). Por tanto, se puede concluir que ambas moléculas formaron un complejo en disolución que impidió en cierta medida la unión de ADN a la superficie. De este modo, la histona H1 interacciona con ADN incluso en su forma agregada, a diferencia del resto de agregados proteínicos.

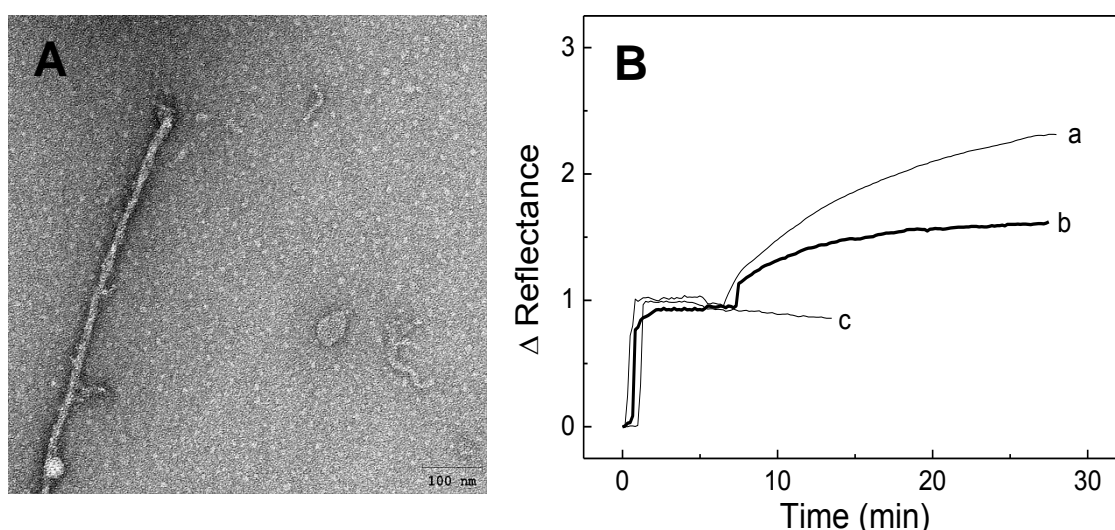


Figura 3.2.11: A. Micrografía electrónica de histona H1 envejecida tras 5 meses a temperatura ambiente. **B.** Ensayo de secuestro de ADN por histona H1 envejecida. La misma muestra de histona H1 vista en la micrografía circuló a 6 $\mu\text{g/mL}$ sobre la superficie del sensor activada por polilisina (curva c). Esta proteína se mezcló con ADN (8 $\mu\text{g/mL}$) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente antes de ser inyectada sobre la superficie del sensor (curva b). La curva **a** es un control de unión de ADN (8 $\mu\text{g/mL}$) a la superficie.

Podríamos pensar que esta unión se debe exclusivamente a la interacción de tipo electrostático entre las cargas positivas de la histona y los grupos fosfato del ADN. Sin embargo, en el caso de los péptidos amiloides parece que existen factores adicionales que determinan la interacción.

$A\beta_{25-35}$ presenta únicamente un aminoácido con carga neta: la lisina 28. La carga positiva de la lisina confiere a los agregados de $A\beta_{25-35}$ carácter de policationes. En cambio, $A\beta_{1-40}$ contiene seis aminoácidos con carga negativa a pH neutro, que compensan la carga de la lisina, y sus agregados se comportan como polianiones. Como muestra la Figura 3.2.12, ambos péptidos son capaces de secuestrar ADN en disolución. El secuestro mediado por $A\beta_{1-40}$ es incluso más eficiente si tenemos en cuenta que se añadió casi a igualdad de masa que el ADN, frente al secuestro provocado por $A\beta_{25-35}$, que fue añadido al doble de concentración. Las curvas **c** de la figura indican que los agregados de amiloide no son inmovilizados en la superficie de polilisina. Como veremos más adelante, oligómeros de $A\beta_{1-40}$ sí pueden unirse, lo que demuestra que el gran tamaño de los agregados condiciona su unión a la superficie.

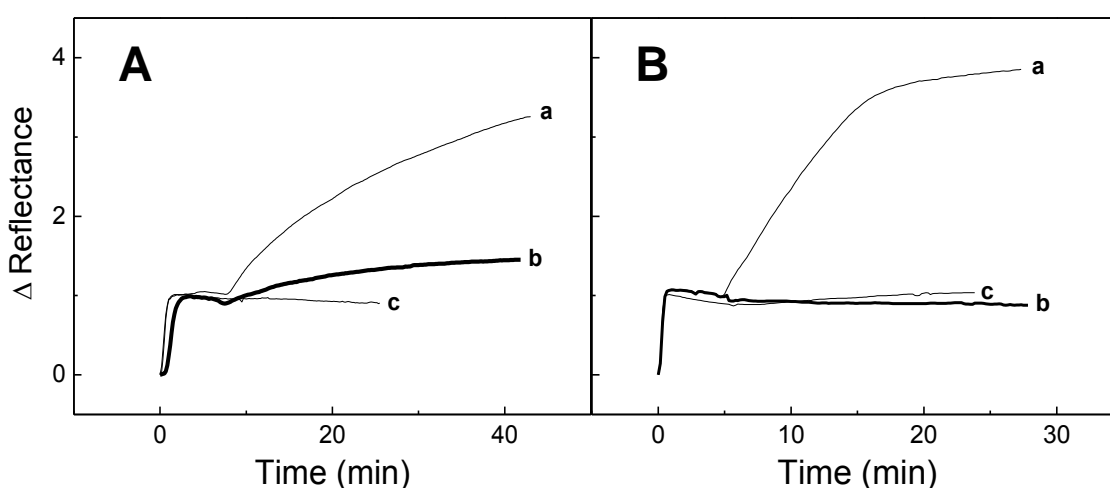


Figura 3.2.12: Ensayos de secuestro de ADN por $A\beta_{25-35}$ envejecido 3 meses (**A**) y $A\beta_{1-40}$ de 2 meses (**B**)
Curvas **a**: Controles de ADN (8 $\mu\text{g/mL}$). Curvas **b**: Mezcla de ADN (8 $\mu\text{g/mL}$) con $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{g/mL}$) en la gráfica **A**, y de ADN (8 $\mu\text{g/mL}$) con $A\beta_{1-40}$ (10 $\mu\text{g/mL}$) en **B**. Ambas mezclas fueron incubadas una hora a temperatura ambiente antes de ser inyectadas sobre la superficie del sensor activada por polilisina. Curvas **c**: Agregados envejecidos de los péptidos $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{1-40}$. Proceden del mismo stock con el que se realizaron los secuestros de ADN. Su edad y concentración coincide con la descrita para las curvas **b**.

Estos resultados demuestran que la interacción ADN-amiloide es un fenómeno único con características específicas no compartidas por el resto de proteínas estudiadas a excepción de la histona H1, y refuerzan la importancia fisiológica que podría adquirir la previsible agregación de péptidos amiloides en el núcleo celular.

3.2.3 Estudio de la interacción entre ADN y oligómeros de A β ₁₋₄₀ por RPS y UV

La velocidad de agregación de A β ₂₅₋₃₅ es muy superior a la de A β ₁₋₄₀, pues como vimos, a las pocas horas de disolverlo ya se aprecian fibras de gran tamaño al microscopio electrónico. Las muestras de A β ₂₅₋₃₅ que utilizamos en los ensayos de secuestro fueron envejecidas durante 3 meses, y es de esperar que la mayor parte del péptido se encontrara en forma de fibras. Estas fibras de amiloide no secuestraron la totalidad del ADN, al contrario que los agregados de A β ₁₋₄₀. El péptido A β ₁₋₄₀ presenta un colectivo muy variado de agregados en disolución que no evolucionan con tanta rapidez, lo que permite realizar ensayos inmovilizándolos sobre polilisina. En la Figura 3.2.13 se recoge uno de estos ensayos en superficie donde el ADN interacciona con oligómeros de A β ₁₋₄₀, que forman una monocapa cuyo espesor aproximado es 1.5 nm.

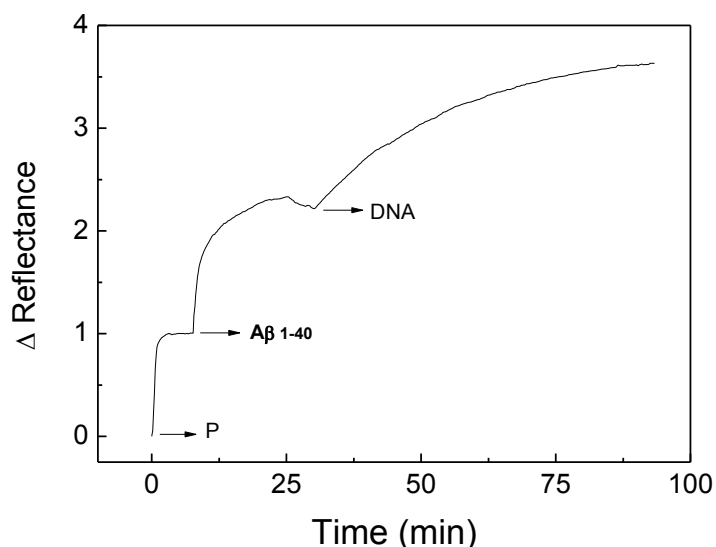


Figura 3.2.13: Unión en superficie de ADN a oligómeros de A β ₁₋₄₀. Se circuló una muestra de A β ₁₋₄₀ a 40 μ g/mL sobre la superficie del sensor activada por polilisina (P). A continuación circulamos ADN (8 μ g/mL) sobre la capa de amiloide. Este péptido se disolvió la semana anterior a 1 mg/mL en Tris 50 mM.

Esta interacción en superficie es especialmente significativa, ya que sugiere la posibilidad de que los oligómeros no fibrosos de tamaño intermedio también puedan unirse al ADN *in vivo*, alterando previsiblemente la expresión génica. La microscopía electrónica de los oligómeros de $A\beta_{1-40}$ muestra formas esféricas que no alcanzan los 50 nm de diámetro, un tamaño muy inferior al de las fibras (Barrantes et al., 2012).

Cuando realizamos ensayos de secuestro de ADN en disolución con dichos oligómeros, lo que se observa es una nueva unión ADN-amiloide en superficie. El espesor que genera el complejo ADN- $A\beta_{1-40}$ formado en disolución coincide exactamente con la suma de los espesores de cada molécula por separado (Figura 3.2.14). Por tanto, siempre que los amiloides tengan un tamaño lo suficientemente pequeño como para unirse a la superficie, no podrán secuestrar ADN en disolución. No obstante, la interacción queda igualmente demostrada mediante los ensayos de unión en superficie. Asimismo la unión de ADN de doble cadena con todas las especies de $A\beta_{1-40}$, agregadas y no agregadas, se comprobó por espectroscopía de absorción UV. Mientras que el espectro de ADN se vio levemente alterado por la presencia de oligómeros envejecidos durante una y 2 semanas (Barrantes et al., 2012), los cambios en el espectro aumentaron al cabo de 2 meses (Figura 3.2.15).

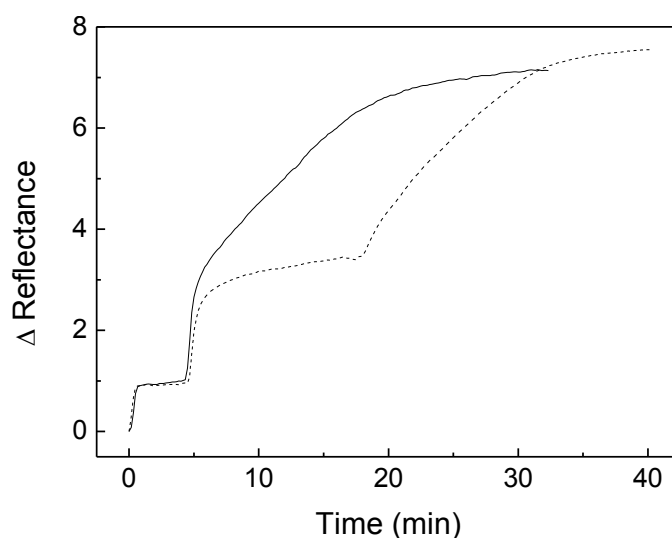


Figura 3.2.14: Oligómeros de $A\beta_{1-40}$ interaccionando con ADN en disolución y en superficie. **Línea continua:** Mezcla de $A\beta_{1-40}$ a 40 $\mu\text{g/mL}$ (disuelto 1 día antes) y ADN a 8 $\mu\text{g/mL}$ incubada 1 hora a temperatura ambiente antes de ser inyectada sobre la superficie del sensor activada por polilisina. **Línea discontinua:** unión en superficie añadiendo ADN a 8 $\mu\text{g/mL}$ sobre $A\beta_{1-40}$ a 40 $\mu\text{g/mL}$ disuelto 1 día antes.

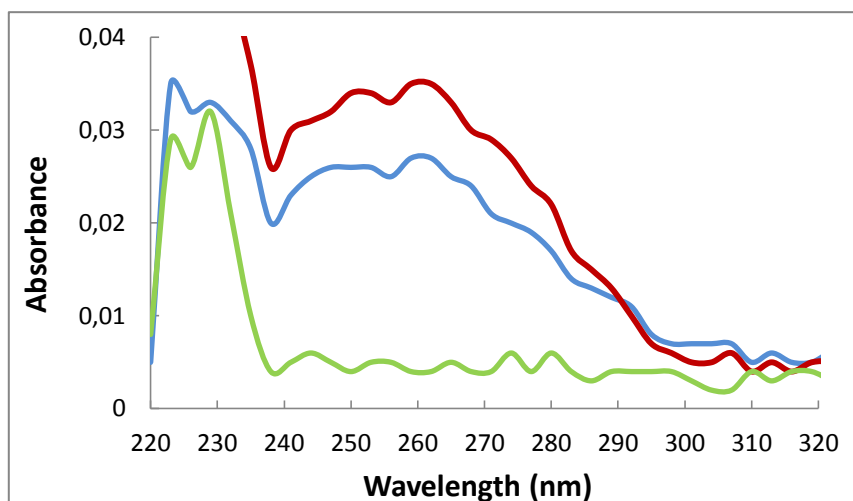


Figura 3.2.15: Espectro UV de oligómeros envejecidos de A β ₁₋₄₀ y ADN. Línea verde: Péptido A β ₁₋₄₀ (40 μ g/mL) agregado después de 57 días a temperatura ambiente. Mostró una absorbancia similar a la del espectro del tampón. Línea azul: Espectro control de ADN doble hebra de timo de ternera a 8 μ g/mL. Línea roja: Mezcla del péptido A β ₁₋₄₀ a 40 μ g/mL y ADN a 8 μ g/mL incubada 1 hora a RT. Los espectros se midieron en NanoDrop y las absorbancias dadas corresponden a un paso de luz $l = 0.1$ cm.

La absorbancia del complejo ADN-A β ₁₋₄₀ fue creciendo a lo largo de las semanas en paralelo al aumento de tamaño de los oligómeros de amiloide. Como vemos en el espectro ultravioleta de la Figura 3.2.15, A β ₁₋₄₀ muestra una mayor absorbancia en la zona de absorción del enlace peptídico, en torno a 220-230 nm. Este incremento de absorbancia puede proceder de la agrupación de oligómeros de A β ₁₋₄₀. El valor de absorbancia que registra el espectrofotómetro no sólo depende de la luz absorbida por la muestra, ya que los agregados de gran tamaño también pueden dispersar la luz (*light scattering*). La diferencia de absorbancia que existe entre el espectro de ADN-A β ₁₋₄₀ (línea roja) y el control de ADN (línea azul) podría deberse a un aumento en la luz dispersada por las fibras de A β ₁₋₄₀, que al entrar en contacto con ADN pueden sufrir algún tipo de cambio conformacional. No obstante, cabe la posibilidad de que al mismo tiempo los agregados induzcan cambios en la estructura del ADN, incluyendo una posible apertura de la doble hélice.

3.2.4 Interacción ADN-A β_{25-35}

El péptido A β_{25-35} ha demostrado una citotoxicidad comparable a la de A β_{1-42} en ensayos *in vitro* (Frozza et al. 2009) y ha terminado por convertirse en un modelo esencial para investigar los mecanismos implicados en la enfermedad de Alzheimer. Recientemente se han aislado monómeros de A β_{1-40} y A β_{1-42} en disolución y se ha conseguido calcular su tamaño aproximado: el radio hidrodinámico del péptido A β_{1-40} es de 0.9 ± 0.1 nm (Nag et al. 2010) y el de A β_{1-42} es 1.01 ± 0.07 nm (Xu et al. 2013). A β_{25-35} es un fragmento de 11 aminoácidos contenido en estos péptidos, que plegado en disolución alcanza pocos nanómetros de longitud y 1 nm de ancho como máximo. Sorprendentemente, esta molécula puede agruparse (ver flecha en Figura 3.2.16) y formar fibras de varios μ M de largo, que unen hilos de ADN como muestra la imagen.

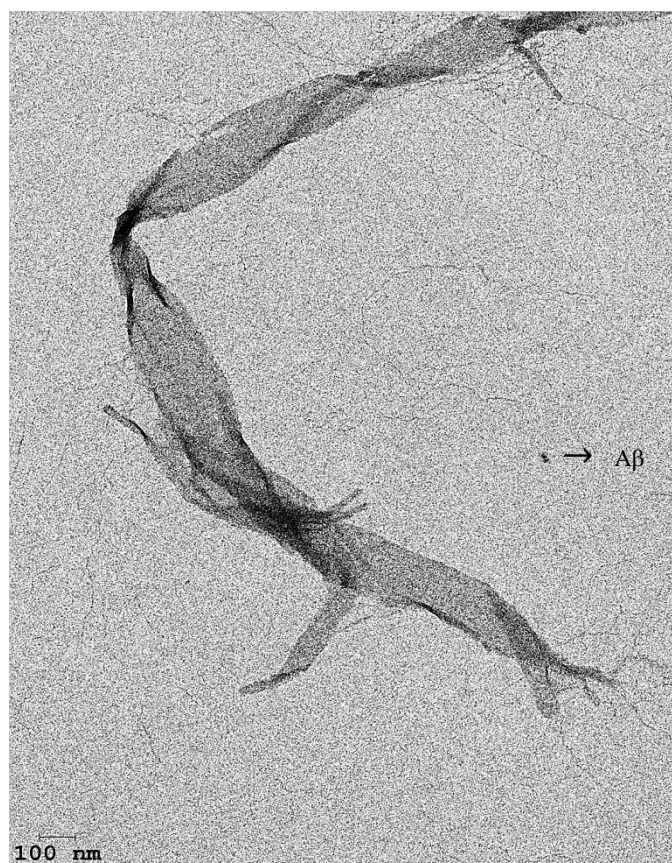


Figura 3.2.16: Micrografía electrónica de fibras de A β_{25-35} interaccionando con ADN. La imagen muestra la tinción negativa de una mezcla de ADN de doble hebra (hilos) a 8 μ g/mL con agregados de A β_{25-35} disueltos en agua destilada y envejecidos 2 meses a RT. La mezcla se incubó una hora a 37°C.

La micrografía permite apreciar regiones donde el agregado de $A\beta_{25-35}$ se dobla sobre sí mismo a modo de cinta. Este comportamiento no se observó en los agregados de $A\beta_{1-40}$, que presentan fibras más finas, con una anchura inferior a 20 nm (Figura 3.2.7B). Además, en la imagen podemos observar hilos de ADN unidos principalmente a los extremos de $A\beta_{25-35}$. La doble hélice de ADN podría por tanto quedar enredada alrededor de estos agregados formando un complejo en disolución.

Para estudiar la evolución de este complejo en tiempo real hicimos uso de la espectroscopía de absorción UV. Como ya vimos en el caso de $A\beta_{1-40}$, esta técnica es eficaz en la detección de especies agregadas. En la Figura 3.2.17 vemos que la línea base de los espectros que contienen $A\beta_{25-35}$ presenta una pendiente creciente a medida que decrece la longitud de onda. Esta deriva se debe de nuevo a la dispersión de luz por parte de los agregados de amiloide. El péptido se mezcló con ADN en una cubeta de cuarzo y a continuación se registró su espectro UV (curva c). La suma teórica del espectro de ADN (a) y $A\beta_{25-35}$ (b) resulta en la curva d, que no coincide con la curva experimental (c), lo que indica la existencia de interacción entre ADN y $A\beta_{25-35}$.

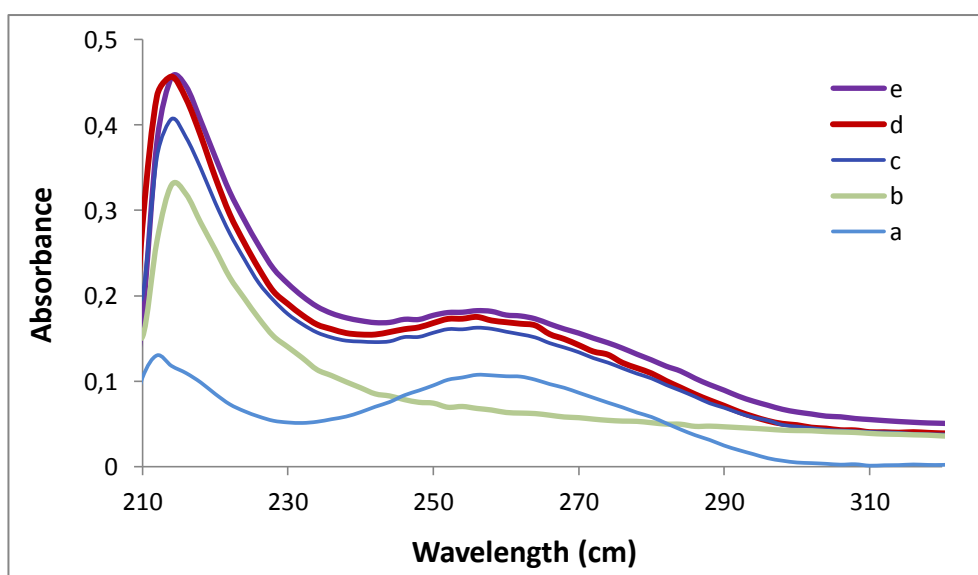


Figura 3.2.17: Espectros UV de $A\beta_{25-35}$ y ADN. a) Espectro control de ADN doble hebra de timo de ternera (4 $\mu\text{g/mL}$). b) Péptido $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{g/mL}$) agregado 20 días a temperatura ambiente. c) Mezcla de ADN (4 $\mu\text{g/mL}$) y $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{g/mL}$) a tiempo cero. d) Suma teórica de las curvas a y b. e) Mezcla de ADN (4 $\mu\text{g/mL}$) y $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{g/mL}$) incubado 1 hora a RT. Los espectros se midieron en cubeta con $l = 1$ cm.

No obstante, las diferencias son más sutiles que en el caso del péptido $A\beta_{1-40}$. La absorbancia fue aumentando levemente hasta estabilizarse al cabo de 1 hora (curva e). Además, es importante señalar que en el momento de añadir ADN a la disolución de $A\beta_{25-35}$ se formó una especie de precipitado tenue, que sin embargo volvía a solubilizarse al agitar la cubeta. Este hecho puede significar la formación de un complejo ADN-amiloide insoluble o la precipitación de agregados de amiloide en presencia de ADN. Para evitar cualquier tipo de error en las medidas de absorbancia agitamos todas las disoluciones justo antes de registrar su espectro.

3.2.4.1 Determinación de la estructura secundaria de $A\beta_{25-35}$ mediante FTIR

Resultaría interesante conocer cuál es la estructura sobre la que se apoya $A\beta_{25-35}$ para entrar en un proceso de agregación tan rápido y organizado como el que hemos visto en repetidas ocasiones. La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una técnica idónea para realizar este tipo de estudios ya que permite monitorizar estructuras incluso de proteínas agregadas. Puesto que sólo disponemos de una pequeña cantidad de péptido puro, aplicamos un protocolo que permite concentrar proteínas adsorbiéndolas en geles que no absorben radiación infrarroja. Con este procedimiento conseguimos mejorar la señal en medio acuoso, que presenta una banda de absorción muy ancha e intensa en torno a 1640 cm^{-1} debida al agua.

En un principio intentamos medir el espectro del péptido $A\beta_{25-35}$ en disolución, disolviéndolo a la máxima concentración posible en agua (1 mg/mL) pero esta concentración fue insuficiente para distinguir la banda amida I de $A\beta_{25-35}$ frente a la del agua. Como alternativa usamos un gel de fosfato de aluminio (Adju-Phos[®]) que tiene carga neta negativa a un pH superior a 5 (Al-Shakhshir et al., 1995). Como $A\beta_{25-35}$ contiene una lisina que le confiere carga neta positiva a pH fisiológico, establece interacción electrostática con el gel. Los agregados de $A\beta_{25-35}$ obtenidos después de un mes a temperatura ambiente fueron incubados con el gel en agitación durante 30 minutos, y a continuación se centrifugó la mezcla para obtener la muestra adsorbida en el gel. La concentración de $A\beta_{25-35}$ en el gel sería entre 5 y 10 veces mayor que la de la muestra de péptido inicial (ver protocolo descrito en Materiales y métodos).

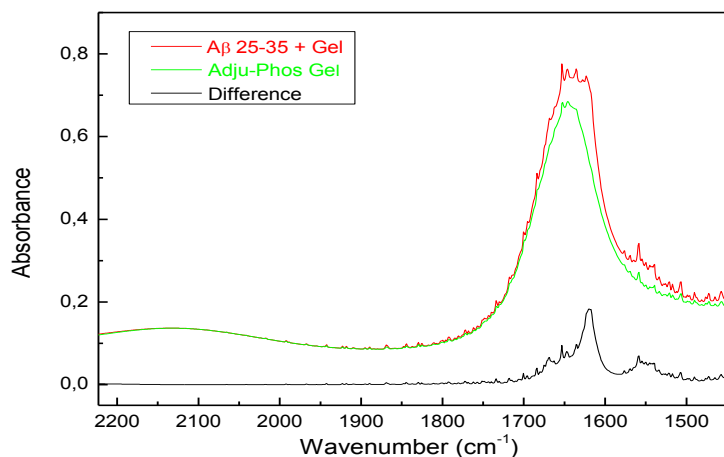


Figura 3.2.18: Espectro IR de $A\beta_{25-35}$ adsorbido en Adju-Phos. La línea verde corresponde al espectro del gel depositado en ventanas de CaF_2 . A continuación medimos el espectro del péptido adsorbido en gel por duplicado y obtuvimos el mismo resultado en ambos casos (línea roja). Igualamos los espectros de gel y $A\beta_{25-35}$ en la región de $1750-2000\text{ cm}^{-1}$ y calculamos su espectro diferencia, mostrado en color negro

Los espectros de proteínas en medio acuoso deben procesarse para eliminar la contribución del agua líquida y del vapor de agua (Dong et al., 1990). El gel adsorbe moléculas de agua que dan una absorbancia cercana a 1 (Figura 3.2.18). El espectro real de $A\beta_{25-35}$ se obtuvo restando el espectro del gel. Dado que obtenemos una línea recta a números de onda comprendidos entre $1800\text{ y }2200\text{ cm}^{-1}$ podemos concluir que la sustracción del agua líquida se efectuó correctamente. Después eliminamos el vapor de agua presente en el equipo restando el espectro del aire (Figura 3.2.19).

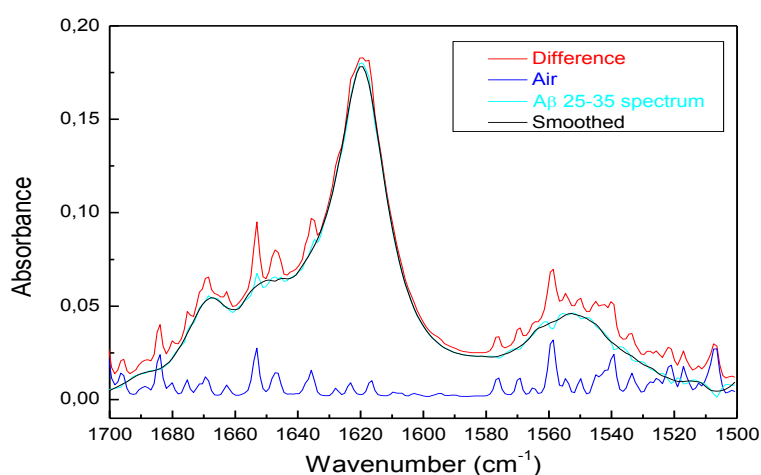


Figura 3.2.19: Sustracción del vapor de agua. Restamos el espectro del aire (azul) al espectro diferencia (rojo), resultando el espectro azul turquesa, que fue suavizado con un filtro de Savitzky-Golay de 5 puntos (negro). La región $1500-1580\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la amida II y $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ a la amida I.

El espectro obtenido después de eliminar el vapor de agua muestra 2 bandas bien diferenciadas: amida I y amida II. Existe una correlación compleja entre la forma de la banda amida II y la estructura secundaria de las proteínas, lo que provocó que no fuera considerada sistemáticamente en estudios cuantitativos de estructura. No obstante, algunos trabajos afirman que las proteínas con un porcentaje mayoritario de lámina beta presentan una amida II muy ancha, centrada alrededor de $1540\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ (Dousseau et al., 1990), lo cual se ajusta bastante bien a la banda de nuestro espectro. Por otro lado, la amida I (Figura 3.2.20) presenta un máximo en 1620 cm^{-1} , una banda que se ha encontrado repetidamente en proteínas agregadas y a la que se asigna una estructura β -lámina intermolecular (Caughey et al., 1991; Dong et al., 1995; Khurana et al., 2000; Zandomenighi et al., 2004). Este resultado encaja con la estructura de $A\beta_{25-35}$ observada en todas las micrografías electrónicas, donde siempre encontramos fibras de amiloide, independientemente de la edad del péptido. Además, estudios anteriores de dicroísmo circular y RMN coinciden al señalar que en medio acuoso $A\beta_{25-35}$ adquiere mayoritariamente estructuras de tipo β -lámina y giro β (D'Ursi et al., 2004; Millucci et al., 2010). Al realizar la deconvolución del espectro hallamos bandas de estas estructuras, con centros en 1634 y 1670 cm^{-1} respectivamente.

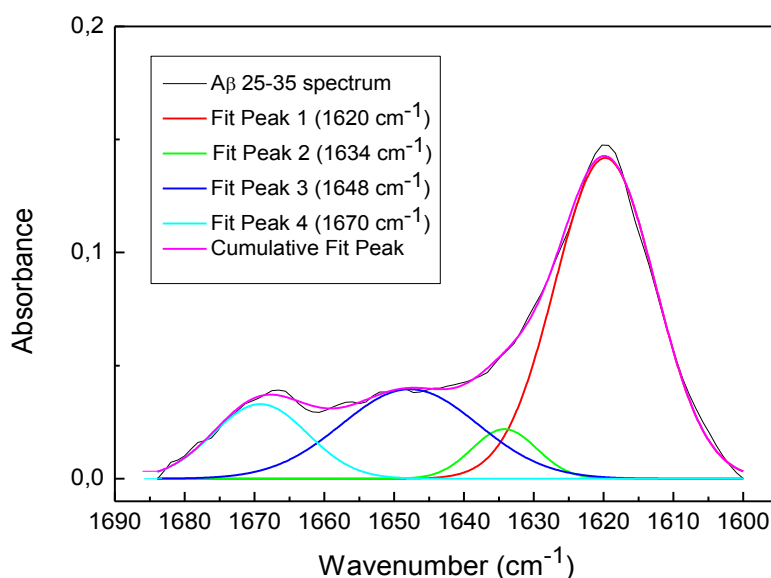


Figura 3.2.20: Deconvolución de la banda amida I de $A\beta_{25-35}$. La banda amida I se ajustó a cuatro gaussianas. Los mínimos de la 2ª derivada del espectro de absorción sirvieron de guía para fijar los centros de los picos. El ajuste convergió y el error estándar de cada pico fue prácticamente nulo.

Los porcentajes de cada banda y su estructura secundaria asignada se presentan en la Tabla 3.2. Podemos concluir que más del 50% del péptido agregado adquiere una estructura de lámina β intermolecular, aunque también existe un pequeño porcentaje de oligómeros con estructuras no ordenadas (*random coil*). Por otra parte, es especialmente significativa la ausencia de α -hélices en nuestra preparación, que concuerda con estudios recientes donde se concluye que $A\beta_{25-35}$ no forma estructuras helicoidales en medios acuosos (Millucci et al., 2010).

A β 25-35		
Fit peak wavenumber (cm ⁻¹)	Secondary structure assignment	% of total structure
1620	Inter β -Sheet	59
1634	β -sheet	6
1648	Random Coil	22
1670	β -Turn	13

Tabla 3.2. Porcentajes de estructuras secundarias extraídos de la banda amida I de $A\beta_{25-35}$ (Fig 3.2.20).

Tras aplicar las funciones precisas para deconvolucionar la banda amida I con Origin 8.6, obtuvimos el área de cada banda por separado. Para calcular los porcentajes consideramos el área total como la suma de bandas centradas en números de onda entre 1600 y 1690 cm⁻¹.

Existen varios estudios previos que determinaron la estructura de $A\beta_{25-35}$ en disolventes orgánicos (revisión en Serpell, 2000). Es bien conocido que el disolvente puede influir en la estructura que el péptido adopta en disolución, así que preferimos usar un medio acuoso como el agua destilada. Cabe destacar que nuestros resultados están de acuerdo con un espectro infrarrojo de $A\beta_{25-35}$ publicado recientemente por otro grupo (Zussy et al., 2011). En este artículo los autores no utilizan geles adyuvantes para concentrar la muestra, obteniendo un espectro cualitativo en agua destilada con 4 picos centrados en posiciones idénticas a las recogidas en nuestra Tabla 3.2. Mediante la deconvolución de la banda amida I aportamos por primera vez información cuantitativa acerca de la estructura agregada de $A\beta_{25-35}$ en medio acuoso. Los elevados porcentajes de lámina β obtenidos indican que esta estructura debe tener cierto peso en la interacción de agregados amiloides con ADN.

Como vimos en los ensayos de SPR, la histona también interacciona con ADN y presenta carga neta positiva a pH fisiológico. Para estudiar si existen similitudes entre su estructura y la del amiloide, disolvimos histonas a 1 mg/mL en HEPES/NaCl, pH 7 y las adsorbimos en el gel de fosfato de aluminio para registrar su espectro IR.

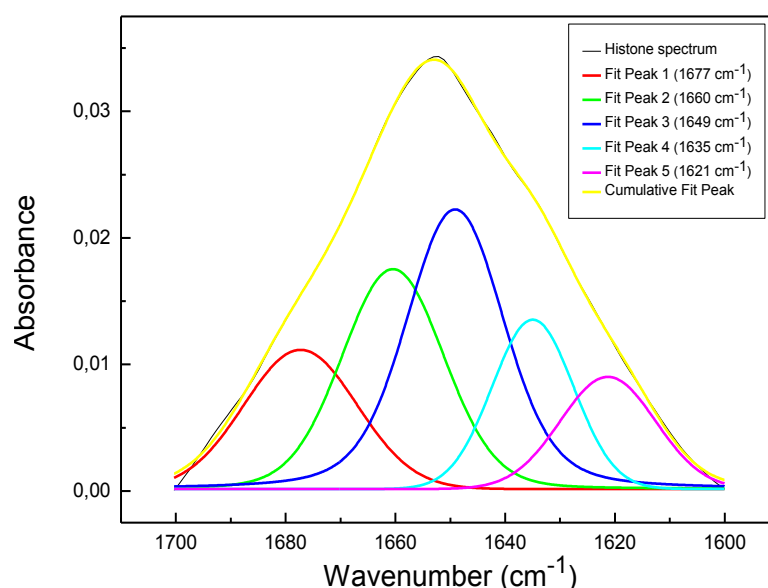


Figura 3.2.21: Deconvolución de la amida I de una preparación fresca de histona no fraccionada.

La histona tipo II-S (mezcla completa, Sigma) se disolvió en tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7. Seguimos el mismo protocolo de incubación y centrifugación con Adju-Phos y procesamos el espectro para eliminar la señal del agua como en el caso de A β ₂₅₋₃₅. La banda amida I se ajustó a 5 gaussianas.

Después de procesar el espectro de histona adsorbida en gel y de corregir su línea base, obtuvimos una campana en la zona de la amida I (Figura 3.2.21). En este caso, la envolvente puede dividirse en una combinación más compleja de gaussianas y es posible obtener varios ajustes convergentes. El ajuste representado en la figura coincide con el de un trabajo ya publicado (Munishkina et al., 2004) que indica una mayor variedad de estructuras secundarias en comparación con los agregados de A β ₂₅₋₃₅. El artículo citado caracterizó los cambios conformacionales que experimenta la histona en función del pH y la fuerza iónica del medio. Las medidas a un pH cercano a 7 y baja fuerza iónica registraron, al igual que en nuestro espectro, una mezcla de láminas β (bandas centradas en 1621 y 1635 cm⁻¹), estructuras desordenadas (1649 cm⁻¹) y giros β (1660 y 1677 cm⁻¹). Es importante señalar que el núcleo central de histonas presente en los cromosomas de la célula contiene dominios intrínsecamente desordenados que facilitan su unión a otras moléculas de la cromatina (Hansen et al., 2006). No obstante, la beta lámina también constituye una proporción importante de la estructura de las histonas, aunque es evidente que el porcentaje de β -lámina intermolecular a pH 7 en la histona es inferior al observado en agregados de A β ₂₅₋₃₅.

3.2.4.2 Interacción de $A\beta_{25-35}$ con oligonucleótidos

En páginas anteriores se confirmó que $A\beta_{25-35}$ interacciona con secuencias aleatorias de ADN de gran longitud. A raíz de un trabajo de 2011 que buscaba la unión de varios fragmentos de péptido amiloide a una secuencia específica (GGATTGGGGT) presente en regiones promotoras de genes implicados en Alzheimer (Maloney & Lahiri., 2011), comenzamos a estudiar la unión de $A\beta_{25-35}$ a pequeñas secuencias de ADN de 20 pares de bases. En dicho trabajo utilizan dos oligonucleótidos como controles en la interacción ADN- $A\beta$. Como control positivo: una secuencia promotora del gen p53, que induce muerte celular, y como control negativo: una secuencia promotora del gen APPHSE, que sólo coincide en 4 bases con la secuencia consenso citada. Mediante ensayos de resonancia de plasmón superficial comprobamos si existe alguna diferencia en la unión de $A\beta_{25-35}$ a una y otra secuencia. Primero verificamos que las hebras hibridan en superficie, como en la Figura 3.1.15. A continuación inmovilizamos la cadena antisentido de p53 o APPHSE sobre polilisina y circulamos la hebra complementaria incubada previamente con $A\beta_{25-35}$. En la Figura 3.2.22 los agregados de amiloide secuestran las cadenas sentido de p53 y APPHSE, impidiendo su hibridación. Este resultado, repetido a baja concentración de amiloide, sugiere que los agregados de $A\beta_{25-35}$ interaccionan con ADN de modo independiente de secuencia.

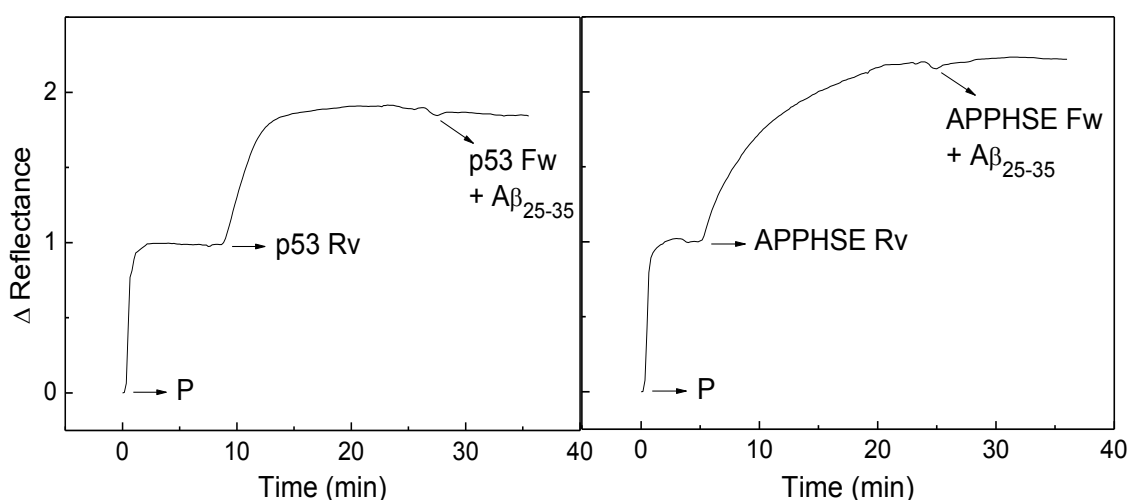


Figura 3.2.22: Ensayos de secuestro de la cadena sentido de los oligos p53 y APPHSE por $A\beta_{25-35}$. Las cadenas sentido (*forward*, *Fw*) de p53 y APPHSE a 6 $\mu\text{g/mL}$ fueron incubadas 1 hora con agregados de $A\beta_{25-35}$ (40 $\mu\text{g/mL}$) antes de ser inyectadas sobre la cadena *reverse* (*Rv*), inmovilizada sobre polilisina.

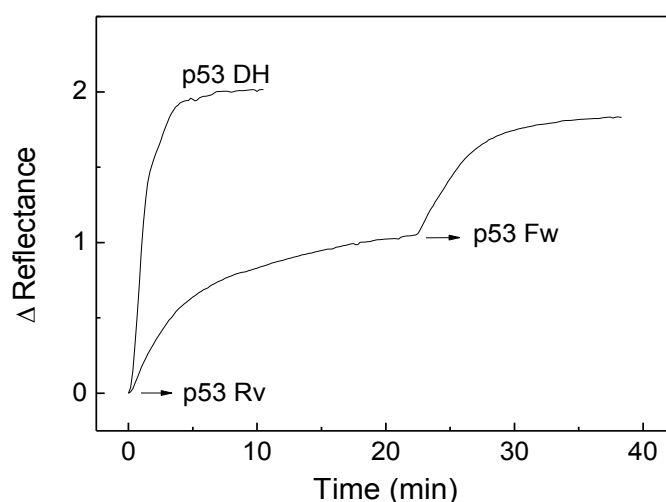


Figura 3.2.23: Oligonucleótidos hibridados en disolución o sobre la superficie de polilisina. La curva p53DH representa la unión a polilisina de la doble hebra de p53 hibridada en disolución. Las hebras sentido y antisentido se incubaron juntas a RT, 5 minutos antes de ser inyectadas en flujo. La otra curva muestra la hibridación en tiempo real de las dos cadenas, tal y como se describió en ensayos anteriores. En ambos casos los oligos se disolvieron a 6 $\mu\text{g/mL}$ en tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, a pH 7.

Una vez estudiado el secuestro de la cadena sencilla nos preguntamos si los agregados de amiloide podrían secuestrar oligos de cadena doble. Para ello primero pusimos a punto la hibridación de cadenas en disolución. El ensayo de inmovilización de la Figura 3.2.23 demuestra que los oligonucleótidos de 20 pb hibridan si los incubamos en la misma disolución a temperatura ambiente, pues el espesor que generan sobre la superficie del sensor coincide con la suma de los espesores de ambas hebras hibridadas. En algunos protocolos recomiendan en primer lugar hervir las hebras para extender su estructura en disolución, y a continuación dejarlas enfriar lentamente para favorecer la hibridación correcta. Por ello realizamos otro ensayo de RPS (Figura 3.2.24) inmovilizando las hebras de un oligo que fueron previamente calentadas a 90°C en el mismo tubo eppendorf durante 10 minutos y a continuación enfriadas progresivamente durante 30 minutos hasta alcanzar 25°C. En dicho ensayo obtuvimos el mismo espesor que en la hibridación a temperatura ambiente (RT), posiblemente debido a que estas hebras tienen un número de bases suficientemente pequeño como para no formar uniones incorrectas de forma estable en disolución. A la vista de que no es imprescindible hervir para que ocurra la hibridación, aplicamos el protocolo de hibridación a temperatura ambiente en todos los ensayos siguientes.

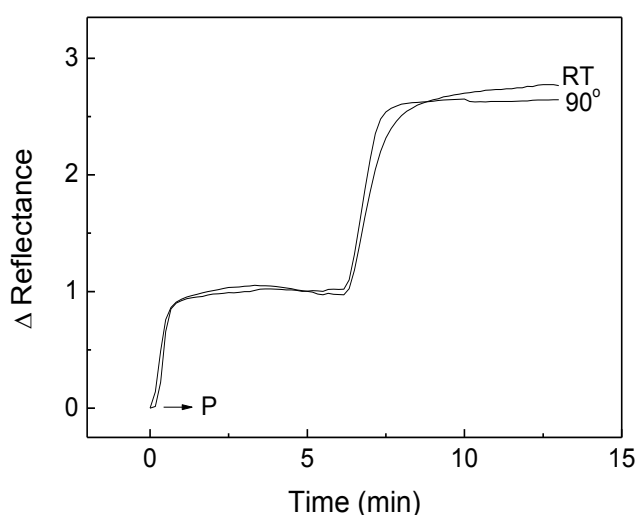


Figura 3.2.24: Inmovilización de oligos de doble cadena hibridados a RT o después de hervir. La curva RT representa la unión a la superficie de polilisina de hebras sentido y antisentido hibridadas tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. En el otro ensayo calentamos las hebras 10 minutos a 90°C y luego las enfriamos 30 minutos hasta llegar a 25°C. En ambos ensayos cada hebra se añadió a 6 µg/mL.

En los ensayos de secuestro hay 3 variables a tener en cuenta: el tiempo de incubación de los oligos hibridados con $A\beta_{25-35}$, la concentración de los oligos y la concentración de $A\beta_{25-35}$. Para conseguir la correcta inmovilización del oligo hibridado, la concentración ideal de cada hebra debe estar próxima a 0.6 µM (en torno a 4 y 6 µg/mL). Incubando los oligos a esta concentración con $A\beta_{25-35}$ a 20 µg/mL observamos interacción parcial, pero en ningún caso secuestro total (Figura 3.2.25).

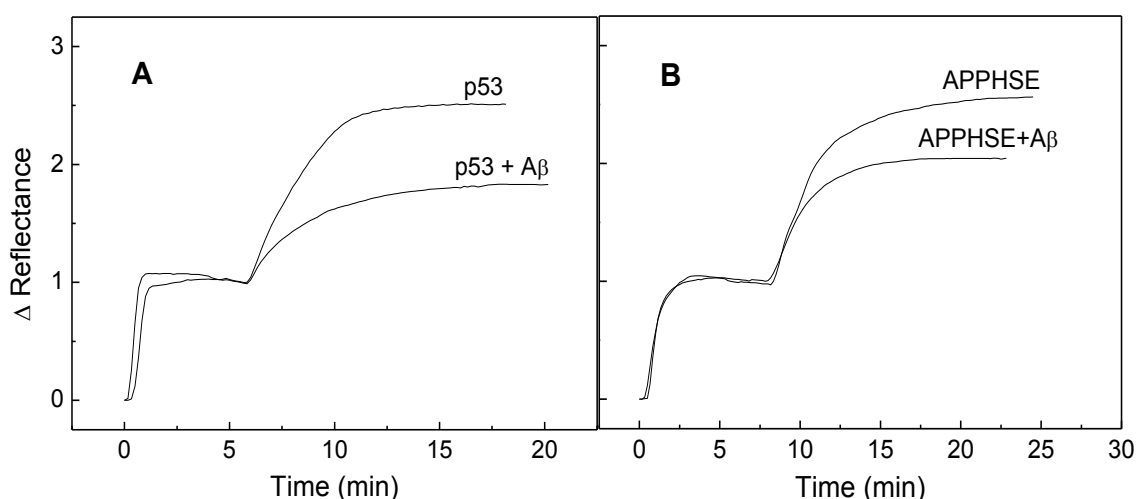


Figura 3.2.25: Ensayos de secuestro de oligos hibridados por $A\beta_{25-35}$. **A)** p53: Hebras Fw y Rv de p53 a 6 µg/mL hibridadas a RT e inyectadas sobre la superficie del sensor activada por polilisina; p53+Aβ: el híbrido anterior se incubó durante 10 minutos con $A\beta_{25-35}$ a 20 µg/mL. **B)** Ensayo de secuestro como en A, pero con oligos hibridados de APPHSE. Todas las muestras se disolvieron en el tampón habitual a pH 7.

3.2.4.3 Inhibición de la interacción entre varias formas de ADN y A β_{25-35} sonicado

A lo largo de nuestro trabajo experimental fuimos testigos de una cierta variabilidad en la interacción de A β_{25-35} con ADN, tanto en los ensayos de secuestro con oligos como en los ensayos con ADN de mayor tamaño. Comprobamos que con el paso de los meses este amiloide perdía progresivamente la capacidad de interactuar con ADN, lo cual nos llevó a pensar que las especies poco agregadas de tamaños intermedios (aquellas que van desapareciendo a medida que se forman las fibras) podrían tener mayor protagonismo en la interacción ADN-amiloide. Para estudiar el comportamiento de estas especies intermedias recurrimos a la sonicación de los agregados. Este proceso rompe las fibras en fragmentos de un tamaño definido mediante ultrasonidos, y nos ofrece la ventaja de partir de un colectivo de especies con un tamaño más homogéneo. En la Figura 3.2.26B podemos contemplar una muestra de A β_{25-35} sonicado que quedó reducido a láminas de unos 200 nm de largo y 50 nm de ancho. En todos los experimentos que describiremos a continuación, los agregados de A β_{25-35} fueron sonicados con un sonicador UP50H (Hielscher Ultrasonics, Germany) 50W, 30KHz a ritmo intermedio (1 ciclo, 70% amplitud).

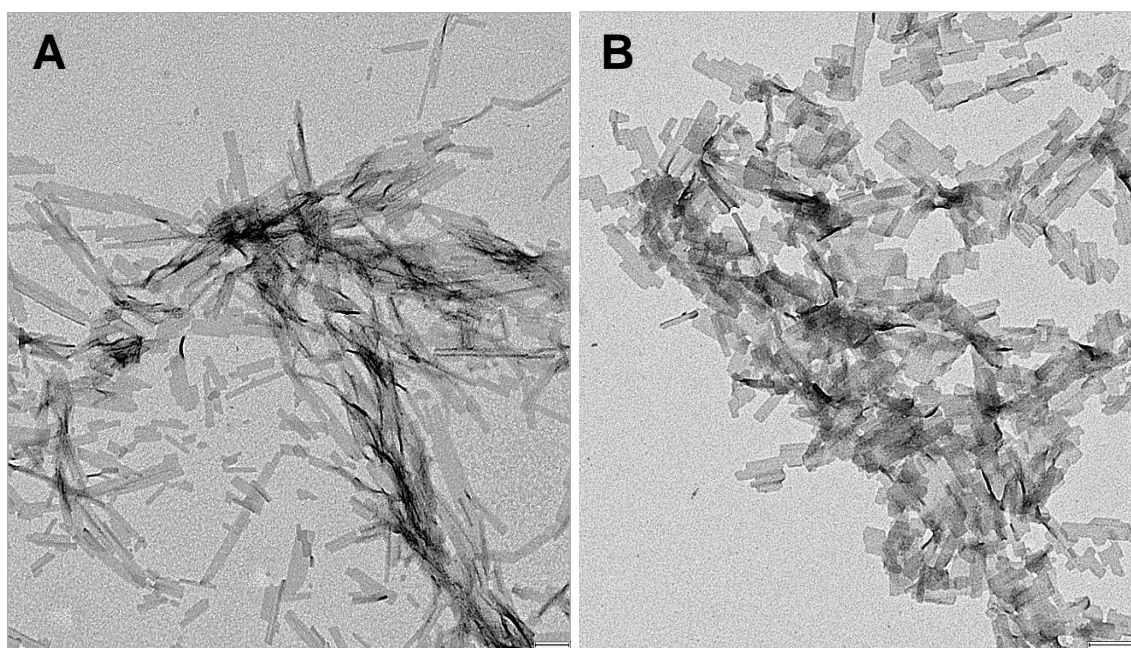


Figura 3.2.26: Micrografía electrónica de A β_{25-35} antes (A) y después (B) de sonicar. Una muestra de A β_{25-35} a 20 μ g/mL, agregado durante semanas, fue sonicada un minuto en el UP50H. Barra = 200 nm.

En los ensayos de secuestro estos agregados sonicados mostraron una gran afinidad tanto por ADN de cadena larga como por oligonucleótidos. La Figura 3.2.27 demuestra que a diferencia de los agregados de $A\beta_{25-35}$, que secuestran parcialmente oligonucleótidos de doble hebra (curva b) los agregados sonicados secuestran prácticamente la totalidad del híbrido (curva c). Este resultado se repitió en varias ocasiones incluso con tiempos de incubación más cortos, lo que sugiere que las especies de amiloide sonicado pueden interaccionar con ADN de forma más eficaz.

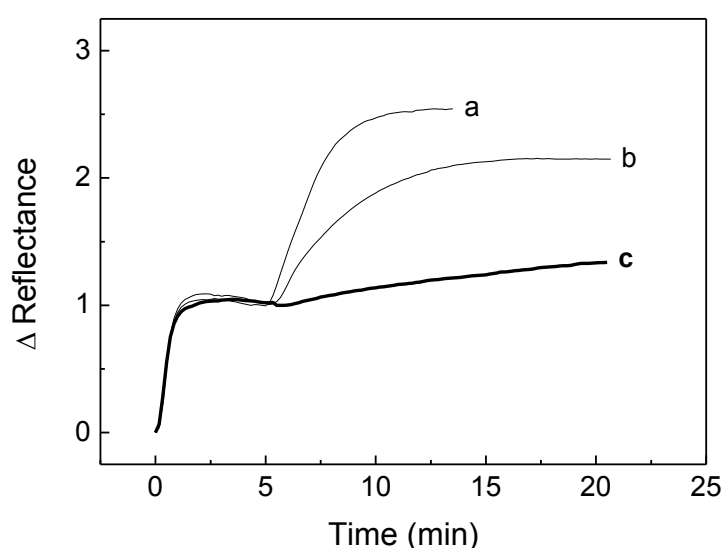


Figura 3.2.27: Ensayos de secuestro de oligos de doble hebra por $A\beta_{25-35}$ sonicado y no sonicado.

a) Control de unión de oligos hibridados (secuencia MAPK14) a $0.6 \mu\text{M}$ sobre la superficie del sensor activada por polilisina. b) Oligos MAPK14 ($0.6 \mu\text{M}$) incubados 30 minutos con agregados de $A\beta_{25-35}$ a $20 \mu\text{g/mL}$. c) Oligos MAPK14 ($0.6 \mu\text{M}$) incubados 30 minutos con agregados sonicados de $A\beta_{25-35}$ ($20 \mu\text{g/mL}$).

La Figura 3.2.28 confirma que $A\beta_{25-35}$ sonicado también presenta una afinidad muy elevada por secuencias largas de ADN y muestra el 1º ensayo de inhibición. Para tratar de inhibir esta interacción buscamos moléculas con una estructura análoga a la de las bases nitrogenadas del ADN, como probenecid. Esta molécula no inhibió la interacción con ADN de cadena larga de forma significativa, posiblemente al tratarse de una interacción masiva en la que hebras de ADN muy voluminosas quedan enredadas con oligómeros de $A\beta_{25-35}$. Dicha unión entre madejas de ADN y cúmulos de amiloide también se caracterizó mediante microscopía electrónica (Figura 3.2.29C).

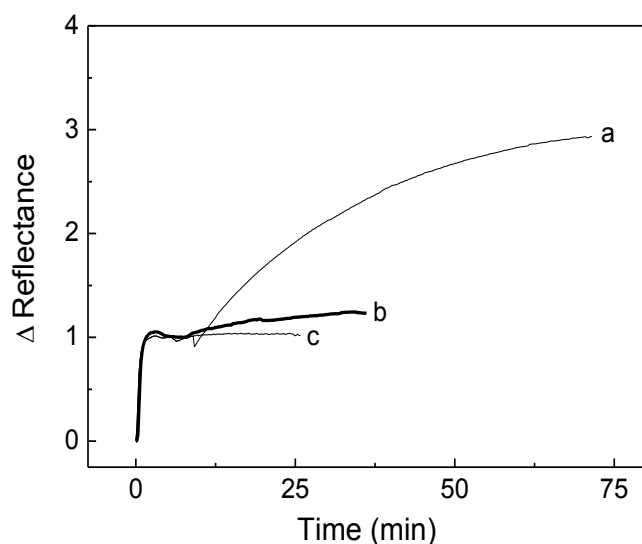


Figura 3.2.28: Ensayos de secuestro de ADN de ternera por $A\beta_{25-35}$ sonificado. **a)** Control de unión de ADN doble hebra ($8\mu\text{g/mL}$) a la superficie de polilisina. **b)** ADN ($8\mu\text{g/mL}$) incubado con $A\beta_{25-35}$ sonificado ($20\mu\text{g/mL}$) en presencia de Probenecid 1 mM , 1 hora. Probenecid se disolvió a 1 mg/mL en HEPES 10 mM , NaCl 100 mM y no se unió a polilisina ni alteró la reflectancia en 1 control previo a 1 mM . **c)** Control de secuestro: ADN de doble hebra ($8\mu\text{g/mL}$) incubado 1 hora con $A\beta_{25-35}$ sonificado ($20\mu\text{g/mL}$).

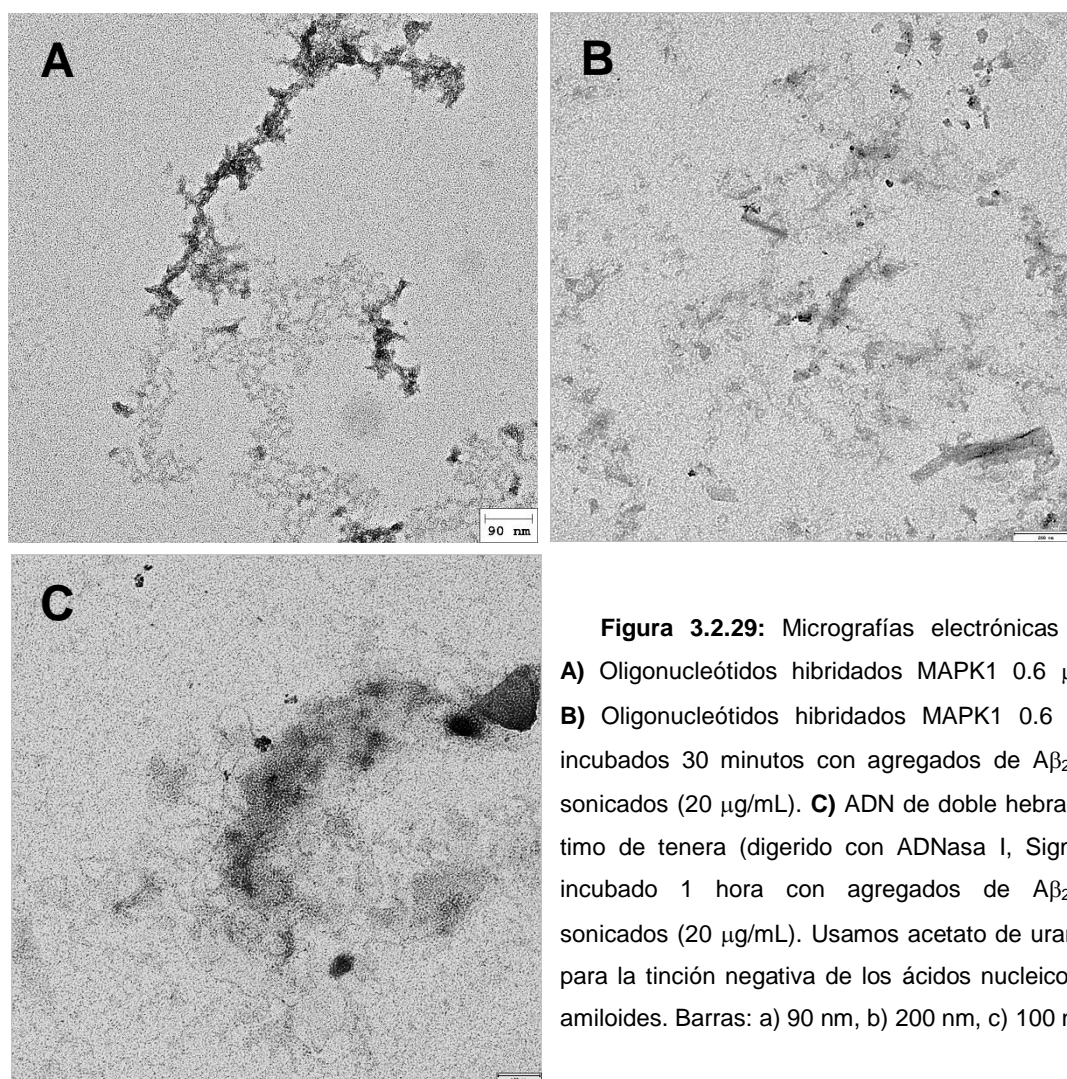


Figura 3.2.29: Micrografías electrónicas de **A)** Oligonucleótidos híbridos MAPK1 $0.6\mu\text{M}$, **B)** Oligonucleótidos híbridos MAPK1 $0.6\mu\text{M}$ incubados 30 minutos con agregados de $A\beta_{25-35}$ sonificados ($20\mu\text{g/mL}$). **C)** ADN de doble hebra de timo de ternera (digerido con ADNasa I, Sigma) incubado 1 hora con agregados de $A\beta_{25-35}$ sonificados ($20\mu\text{g/mL}$). Usamos acetato de uranilo para la tinción negativa de los ácidos nucleicos y amiloides. Barras: a) 90 nm , b) 200 nm , c) 100 nm .

Teniendo en cuenta que *in vivo* el ADN estaría protegido por una gran variedad de proteínas, entre ellas el voluminoso *core* de histonas, resulta difícil imaginar que este tipo de interacciones masivas pueda ocurrir en el núcleo celular. Para acercar un poco más nuestro modelo a un plano fisiológico, sonicamos también una muestra de ADN de timo de ternera y la incubamos con $A\beta_{25-35}$ sonificado, evaluando a continuación su comportamiento en un ensayo de secuestro. Como vemos en la Figura 3.2.30A después de la sonicación obtenemos hilos de ADN troceados en fragmentos de menor longitud. Estos hilos también son secuestrados por $A\beta_{25-35}$ sonificado, pero hay una diferencia importante, ya que esta vez conseguimos una inhibición notable del secuestro añadiendo probenecid a la disolución (curva b). Este resultado abre la puerta a un posible mecanismo para frenar las interacciones ADN- $A\beta$ amiloide, ya que parece que al reducir la superficie de unión entre ambas moléculas, los análogos de nucleótidos sí podrían actuar como competidores efectivos de $A\beta$. Para comprobarlo ampliamos los ensayos de inhibición de secuestro con probenecid a oligonucleótidos de doble hebra, y como veremos a continuación, obtuvimos una inhibición similar.

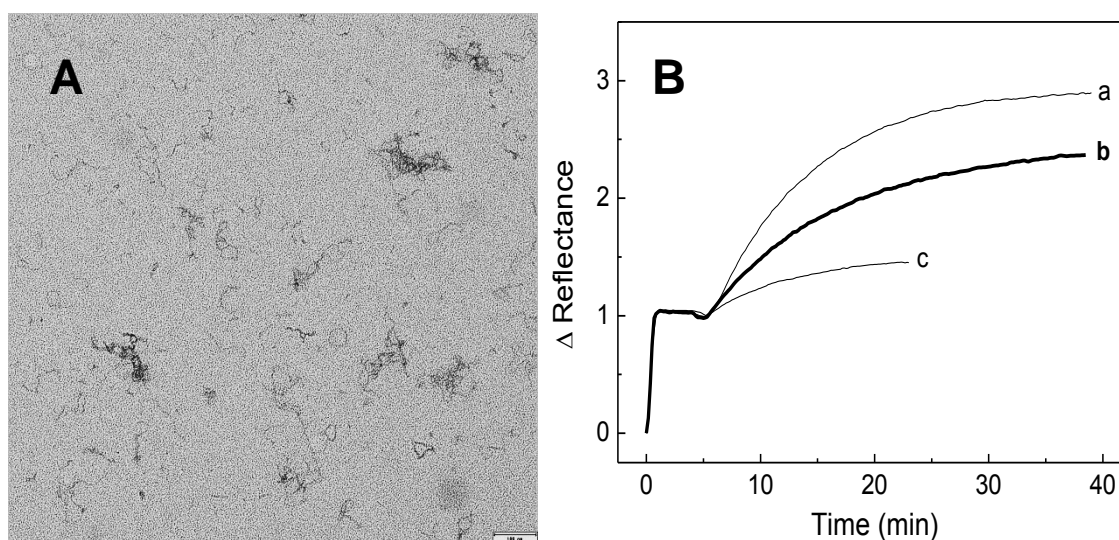


Figura 3.2.30: A) Micrografía electrónica de ADN (8 $\mu\text{g/mL}$) doble hebra de timo de ternera sonificado
B) Ensayos de secuestro de ADN sonificado por $A\beta_{25-35}$ sonificado. Curva a: Control de unión de ADN de timo de ternera sonificado (8 $\mu\text{g/mL}$) a la superficie del sensor activada por polilisina. Curva b: ADN sonificado (8 $\mu\text{g/mL}$) incubado 45 minutos con $A\beta_{25-35}$ sonificado (20 $\mu\text{g/mL}$) en presencia de probenecid 1 mM. Curva c: Control de ADN sonificado (8 $\mu\text{g/mL}$) incubado 45 minutos con $A\beta_{25-35}$ sonificado (20 $\mu\text{g/mL}$).

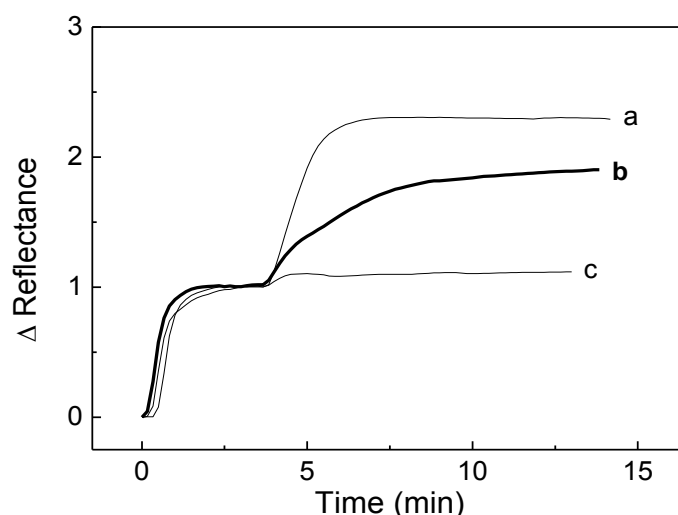


Figura 3.2.31: Ensayos de secuestro de oligonucleótidos doble hebra (p53) por $A\beta_{25-35}$ sonificado, en presencia y ausencia de probenecid. Curva a: Control de unión de las cadenas hibridadas de p53 0.6 μ M (incubadas 5 minutos antes a RT) a la superficie del sensor activada por polilisina. Curva b: Incubación de p53 0.6 μ M con $A\beta_{25-35}$ sonificado (20 μ g/mL) 40 minutos en presencia de probenecid 1 mM. Curva c: Control de secuestro incubando durante 40 minutos p53 0.6 μ M con $A\beta_{25-35}$ sonificado (20 μ g/mL).

La Figura 3.2.31 confirma que el péptido $A\beta_{25-35}$ sonificado, con una mayoría de especies no fibrosas en disolución, es capaz de secuestrar totalmente una pequeña secuencia de ADN con 20 pares de bases. El resultado contrasta con el de la Figura 3.2.25, donde este tipo de secuestro no ocurrió al incubar la misma secuencia con agregados de $A\beta_{25-35}$ no sonicados, lo que demuestra la eficacia de la interacción ADN- $A\beta$ sonificado. En el hipotético caso de que pequeños oligómeros de amiloide penetraran en el núcleo celular, existiría la posibilidad de que pudieran unirse al ADN de acuerdo con estos ensayos de secuestro *in vitro*. No menos importante es el hecho de que el fármaco probenecid inhibe parcialmente el secuestro y por tanto, sería un candidato a tener en cuenta para dificultar esa interacción aberrante *in vivo*. La inhibición se observó en repetidas ocasiones, incluso con oligonucleótidos de distintas secuencias, si bien es cierto que no hubo una inhibición total de la interacción, pues en ningún caso se llegó a recuperar la reflectancia del oligo control. Este tipo de interacción residual parece difícil de impedir, tal vez porque, aun habiendo sonificado los agregados, su tamaño en la disolución es muy grande y arrastran siempre una cierta proporción de oligos. Otras moléculas de bajo peso molecular como el aminoácido glicina ni siquiera inhiben parcialmente esta interacción (Figura 3.2.32).

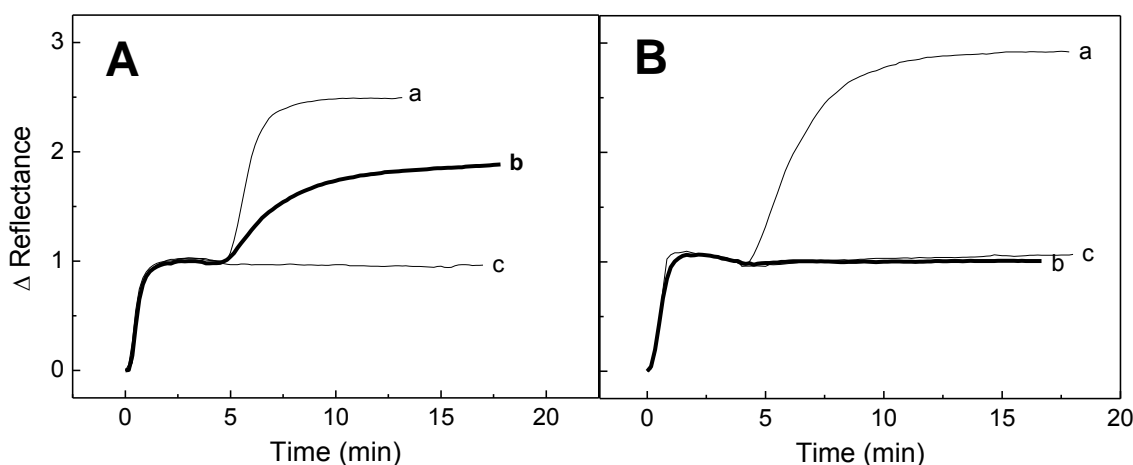


Figura 3.2.32: Ensayos de secuestro de oligonucleótidos doble hebra por $A\beta_{25-35}$ sonificado, en presencia y ausencia de probenecid o glicina. Curvas a: Control de unión de oligos hibridados (0.6 μ M) con las secuencias APPHSE (panel A) o MAPK2 (panel B). Curvas b: Incubación de oligos (0.6 μ M) con $A\beta_{25-35}$ sonificado (20 μ g/mL) durante 40 minutos en presencia de probenecid 1 mM (A) o glicina 1 mM (B). Curvas c: Control de secuestro; incubación de 40 minutos de oligos (0.6 μ M) con $A\beta_{25-35}$ sonificado (20 μ g/mL). Probenecid y glicina se disolvieron en el tampón habitual: HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.

Podríamos decir, por tanto, que la glicina es un control negativo de la inhibición. A lo largo de la tesis probamos varias moléculas como taurina, 5'-hidroxyndol o ATP, que tampoco mostraron ningún efecto inhibitorio significativo. En cambio, otras moléculas como el antibiótico tetraciclina o AMP, que también contienen anillos aromáticos en su estructura, sí dificultaron en cierta medida la interacción entre los oligonucleótidos y $A\beta_{25-35}$ (Figura 3.2.33). Tanto probenecid como tetraciclina son fármacos ya comercializados desde hace años y su absorción y concentración en el plasma sanguíneo de pacientes se conoce por diversos estudios. La concentración de probenecid aproximada que hemos usado en los ensayos de inhibición de secuestro (285 μ g/mL = 1 mM) se encuentra dentro del rango fisiológico de acuerdo con los niveles de absorción en pacientes (Selen et al., 1982). Sin embargo, la concentración de tetraciclina necesaria para provocar una inhibición parcial (150 μ g/mL = 0.34 mM) excede en un orden de magnitud la concentración detectada en plasma tras la administración oral (Agwuh et al., 2006). Por otra parte, los niveles de AMP en el cerebro de mamíferos son muy bajos (<0.03 mM), casi 100 veces inferiores a la concentración de ATP en condiciones normales (Erecińska et al., 1989).

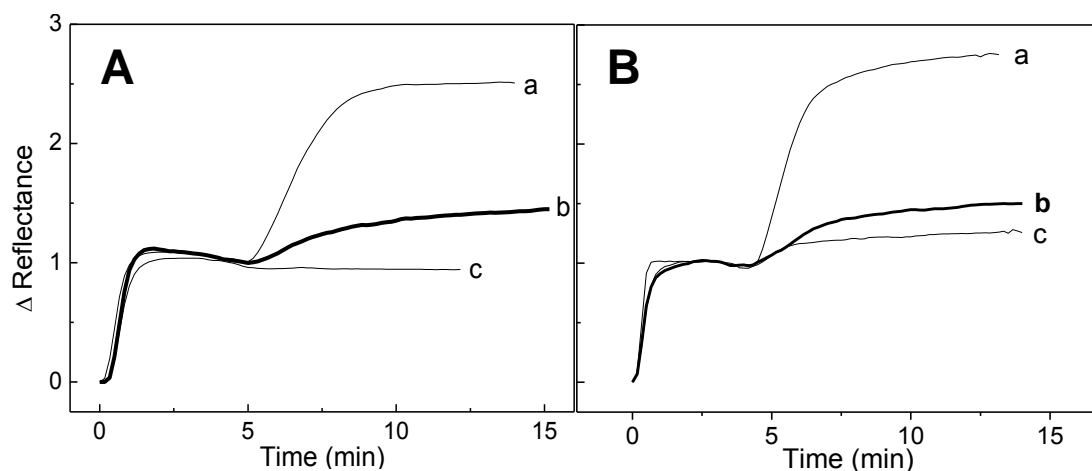


Figura 3.2.33: Ensayos de secuestro de oligonucleótidos doble hebra por $A\beta_{25-35}$ sonicado, en presencia y ausencia de tetraciclina o AMP. Curvas a: Control de unión de oligos hibridados (0.6 μ M) con las secuencias MAPK1 (panel A) o MAPK2 (panel B). Curvas b: Incubación de oligos (0.6 μ M) con $A\beta_{25-35}$ sonicado (20 μ g/mL) en presencia de tetraciclina 0.34 mM (A) o AMP 1 mM (B) durante 1 hora. Curvas c: Control de secuestro, incubación de $A\beta_{25-35}$ sonicado (20 μ g/mL) con oligos (0.6 μ M) 1 hora. Tetraciclina y AMP se disolvieron en el tampón habitual: HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7. Ambas moléculas no se unen a polilisina ni inducen aumentos de reflectancia a las concentraciones ensayadas.

3.2.4.4 Inhibición de interacción entre el complejo ADN-histona y $A\beta_{25-35}$ sonicado

La interacción ADN-amiloide estudiada en esta tesis se postula como uno de los factores que podrían dar origen a la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, es preciso recordar que estas interacciones anómalas tendrían lugar en el interior de las neuronas, que presentan unas características muy particulares. De hecho, la mayor parte de las neuronas no se replica y su ADN se encuentra continuamente unido a histonas. En estas condiciones cabe preguntarse si los oligómeros de amiloide también podrían interaccionar con un complejo ADN-histona. Para comprobarlo recurrimos a un modelo *in vitro* formado por ADN de timo de ternera de secuencias largas (Sigma) y una mezcla de histonas (tipo II-S, Sigma). Esta mezcla ADN-histona ya se usó anteriormente en estudios de interacción con proteína Tau y quedó demostrado que era capaz de unirse a la superficie del sensor activada por heparina.

Es evidente que el ADN queda unido a las histonas, ya que la mezcla genera un espesor en superficie muy superior al que observamos cuando inyectamos la mezcla de histonas por separado (Figura 3.2.34). Sabemos que el ADN, debido al exceso de cargas negativas de sus grupos fosfato, es incapaz de unirse a la superficie de heparina, cargada negativamente, y por tanto, el único medio que tiene para quedar inmovilizado es a través de la formación de un complejo con histona.

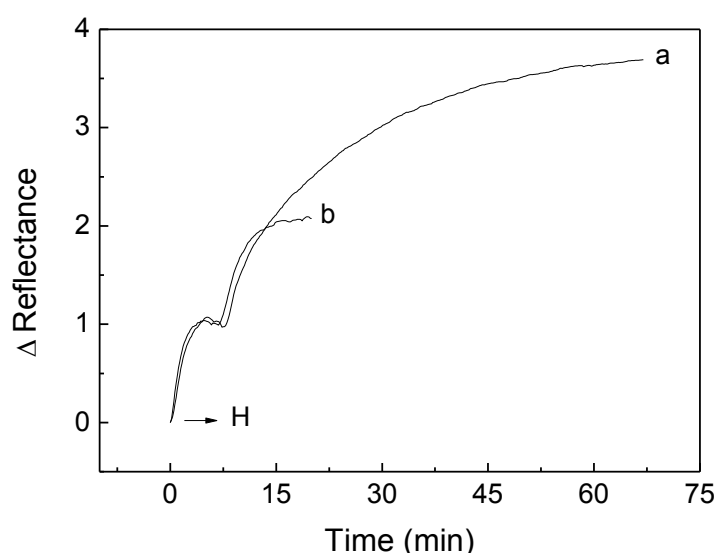


Figura 3.2.34: Inmovilización del modelo ADN-histona sobre la superficie del sensor activada por heparina. Curva a: histonas (8 $\mu\text{g/mL}$) incubadas durante 45 minutos con ADN de doble hebra de timo de ternera. Curva b: control de unión de histonas (8 $\mu\text{g/mL}$) a la superficie del sensor activada por heparina (H). Los incrementos de reflectancia se normalizaron dividiendo por el valor alcanzado por la heparina.

Después de varios ensayos comprobamos que es imprescindible incubar la mezcla ADN-histona durante más de 30 minutos antes de circularla sobre la superficie, ya que de lo contrario, su unión a heparina es muy débil. Dicho fenómeno puede deberse a que estas moléculas invierten un tiempo fijo en formar un complejo estable. Una vez puesta a punto la inmovilización del complejo ADN-histona, pasamos a los ensayos de secuestro por $\text{A}\beta_{25-35}$. Llevamos a cabo una serie de pruebas variando las relaciones en masa de la mezcla ADN-histona/ $\text{A}\beta_{25-35}$ y los tiempos de incubación de cada uno de los componentes. Constatamos que el secuestro total de ADN-histona sólo se produce después de incubar la mezcla con $\text{A}\beta_{25-35}$ durante más de 40 minutos. Asimismo, la concentración de amiloide sonificado debe ser 20 $\mu\text{g/mL}$ como mínimo.

Como muestra la Figura 3.2.35, la presencia de probenecid 1 mM no inhibe el secuestro total. El resultado es análogo al que vimos en la Figura 3.2.28, donde esta molécula no era capaz de impedir el secuestro de ADN de timo de ternera por $A\beta_{25-35}$ sonificado. A la vista de que se trata de un secuestro masivo difícil de inhibir, decidimos sustituir el ADN de cadena larga por los oligonucleótidos de 20 pares de bases.

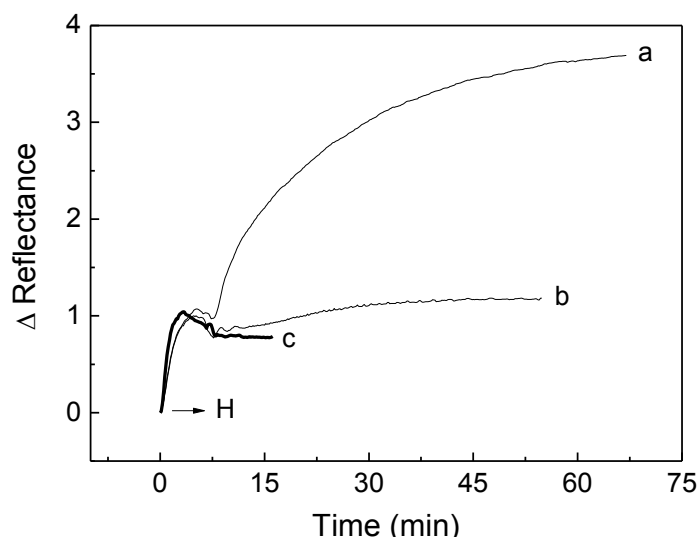


Figura 3.2.35: Ensayos de secuestro de ADN-histona por $A\beta_{25-35}$ sonificado. Curva a: Control de unión de la mezcla ADN (8 $\mu\text{g/mL}$) – histonas (8 $\mu\text{g/mL}$) incubada 45 minutos a temperatura ambiente. Curva b: Secuestro del complejo descrito en la curva a, por $A\beta_{25-35}$ sonificado (20 $\mu\text{g/mL}$). La mezcla ADN-histona se incubó con el amiloide durante 1 hora. Curva c: Ensayo de secuestro igual que el descrito en la curva b, pero en presencia de probenecid 1 mM. Todos los ensayos se hicieron en el tampón habitual, a pH 7.

El complejo que forman los oligonucleótidos con la mezcla de histonas tiene propiedades diferentes a las del complejo que forma el ADN de cadena larga, ya que no pudo ser inmovilizado sobre la superficie de heparina y en cambio se unió sin problema a la superficie del sensor activada por polilisina (Figura 3.2.36). Este comportamiento indica que los oligos deben quedar expuestos alrededor de la histona, repeliendo la unión a una superficie con carga negativa (heparina) pero uniéndose a las cargas positivas de la polilisina. De nuevo es fácil demostrar la unión de la histona a las secuencias de ADN, ya que el espesor que forma la mezcla es superior al que genera el oligo por separado unido a polilisina (curvas a y b). Cuando incubamos este modelo oligo-histona con $A\beta_{25-35}$ sonificado volvió a producirse un secuestro total de la mezcla. Sin embargo, en este caso, el efecto de probenecid 1 mM es más significativo.

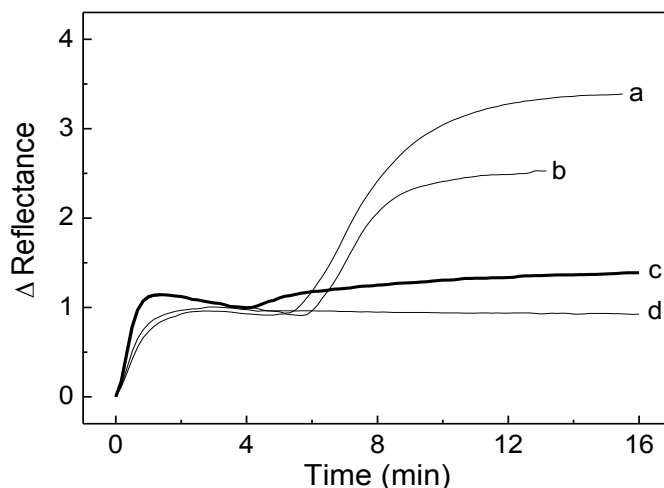


Figura 3.2.36: Inmovilización de la mezcla oligo-histona sobre la superficie de polilisina. Curva a: Control de unión de la mezcla GSK3 β hibridado (8 μ g/mL)/ histonas (8 μ g/mL) incubada 30 minutos a temperatura ambiente. Curva b: Control de unión del oligo GSK3 β hibridado (8 μ g/mL). Curva d: Secuestro del complejo descrito en la curva a, por A β ₂₅₋₃₅ sonificado (20 μ g/mL). La mezcla oligo-histona se incubó con el amiloide durante 30 minutos. Curva c: Ensayo de secuestro igual que el descrito en la curva d, pero en presencia de probenecid 1 mM. Todos los ensayos se hicieron en el tampón habitual, a pH 7.

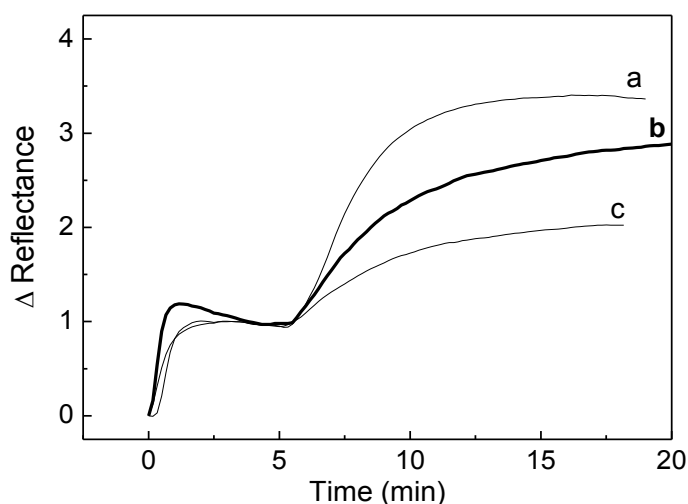


Figura 3.2.37: Ensayos de secuestro de la mezcla oligo-histona por A β ₂₅₋₃₅ sonificado. Curva a: Control de unión de la mezcla GSK3 β hibridado (8 μ g/mL)/ histonas (8 μ g/mL) incubada 45' a RT. Curva c: Secuestro del complejo descrito en la curva a, mediante incubación de 30' con A β ₂₅₋₃₅ sonificado (8 μ g/mL). Curva b: secuestro en las mismas condiciones que la curva c, pero en presencia de probenecid 1 mM.

Por último, la Figura 3.2.37 señala que cuando el secuestro del complejo oligo-histona es parcial (curva c) la protección ejercida por probenecid es más eficaz (curva b).

4

Discusión

4.1 Interacción Tau-ADN: un proceso fisiológico

4.1.1 La unión reversible de monómeros de Tau al ADN tiene un papel funcional

El estudio cinético y termodinámico que llevamos a cabo con la proteína no fosforilada proporciona un amplio abanico de información novedosa en lo que respecta a la interacción Tau-ADN. Al disponer de un sistema de medida en tiempo real como es la resonancia de plasmón superficial, hemos conseguido constatar que Tau puede formar un complejo reversible con ADN. Además, la RPS nos permitió calcular la constante de equilibrio del complejo Tau-ADN de forma fiable. Prueba de ello es la similitud entre el valor de la constante suministrado por el modelo cinético, que asume un pseudo-primer orden de reacción, y el valor obtenido a partir de la fracción de saturación, lo cual respalda el modelo propuesto.

Existe un estudio previo *in vitro* en la bibliografía que calculó la constante de disociación mediante electroforesis capilar, un sistema que se aleja más de las condiciones fisiológicas al realizar el ensayo en presencia de un campo eléctrico (Krylova et al., 2005). Como muestra de ADN utilizaron oligonucleótidos de entre 15 y 20 pares de bases, que difieren de nuestro ADN de cadena larga, digerido en una gran variedad de tamaños comprendidos entre varios miles de pares de bases (Georgiou et al., 2009). Además, en nuestros ensayos de RPS la molécula de ADN se encuentra inmovilizada en superficie, algo que no ocurre en la electroforesis, donde las interacciones tienen lugar en disolución. Estas diferencias entre ensayos pueden explicar que el valor de nuestra constante de disociación: $K_d = 0.04 \mu\text{M}$, sea aproximadamente un orden de magnitud menor que el publicado para la unión de Tau a oligonucleótidos. Finalmente, es factible que la proteína quede enredada en los fragmentos de ADN más largos formando un complejo más estable, lo cual se refleja en un menor grado de disociación. En cualquier caso, este modelo nos aproxima al tipo de interacciones que el ADN nucleosómico podría establecer en el núcleo celular. Si consideramos los valores publicados para la constante de disociación de Tau de los microtúbulos, $K_d = 0.1 \mu\text{M}$ (Ackmann et al., 2000) podemos afirmar que la proteína Tau se une al ADN con una afinidad comparable a la descrita para microtúbulos. Además,

la concentración de Tau en neuronas oscila en torno a 2 μM (Khatoon et al., 1992) así que la cantidad disponible *in vivo* es más que suficiente para saturar los sitios de unión a ADN, formando un complejo estable en disolución.

Por último, hemos podido comprobar que la agregación de Tau afecta a la reversibilidad de la interacción. Las muestras de Tau fresco, con un tamaño equiparable al de monómeros medidos por AFM (Barrantes et al., 2009) se unieron a ADN de forma reversible en las semanas siguientes a su purificación. Por el contrario, ensayos con Tau realizados meses después de su purificación muestran uniones irreversibles al ADN. Este comportamiento iba unido a un aumento en el tamaño de las especies de Tau, como demuestran las imágenes de microscopía electrónica, y resulta de un proceso de agregación a temperatura ambiente. Existen estudios adicionales en la bibliografía que afirman que la interacción Tau-ADN es un proceso dependiente del estado de agregación de Tau (Hua et al., 2002). Por otra parte, en neuronas se ha demostrado que la proteína transita entre el núcleo y el citoplasma en respuesta a determinados factores de estrés (Sultan et al., 2011). En suma, la agregación de Tau, además de romper el equilibrio reversible de unión a ADN, debe de suponer un obstáculo para su entrada y salida del núcleo, favoreciendo una acumulación anómala en determinados compartimentos celulares. Si el papel de Tau en el núcleo celular consiste en proteger al ADN como se ha demostrado repetidamente, la agregación asociada a desajustes en la fosforilación le impediría realizar su función, contribuyendo a iniciar o agravar un proceso patológico.

4.1.2 La fosforilación de Tau inhibe su interacción con ADN *in vitro* e *in vivo*

Las proteínas expresadas en *E.coli* no están sujetas a la acción de chaperonas ni a modificaciones post-traduccionales propias de las células eucariotas. No obstante, como la proteína Tau presenta una estructura secundaria desordenada en condiciones nativas (von Bergen et al., 2005) no necesitamos que sea plegada por la maquinaria celular. De hecho, a lo largo del proceso de purificación fue sometida a diversos tratamientos en medios ácidos y a elevadas temperaturas que no provocaron ninguna alteración de su estructura. Esta extraordinaria resistencia a agentes desnaturalizantes es la que Tau podría utilizar a modo de escudo para proteger la estructura del ADN.

El ADN de las células sufre un gran número de ataques externos a lo largo de la vida de un individuo, ya sea en forma de estrés térmico, radicales libres, radiaciones ionizantes o sustancias tóxicas, que al entrar en el núcleo celular reaccionan con ADN provocando roturas y mutaciones en su secuencia. Estas agresiones se multiplican en el caso de las neuronas, que deben acompañarnos durante toda nuestra vida. Por ello, cobra sentido la hipótesis planteada recientemente, que apunta a la proteína Tau como un posible guardián del genoma. En un trabajo reciente se constata esta función protectora en el núcleo de neuronas y se demuestra que la proteína Tau, sintetizada en el citoplasma, debe ser previamente defosforilada en ciertos residuos antes de translocarse al núcleo (Sultan et al., 2011), siguiendo un mecanismo ya descrito en múltiples factores de transcripción (Hao et al., 2013). Este hecho encaja con nuestros resultados *in vitro* en los que Tau purificado en *Escherichia coli*, no fosforilado, puede unirse tanto a la doble hélice de ADN como a una mezcla de ADN con histonas usado como modelo de nucleosoma. En cambio, la fosforilación masiva de la proteína Tau expresada en células eucariotas redujo claramente su interacción con ADN. No es la primera vez que se documenta este efecto, aunque hasta la fecha, los datos disponibles en la bibliografía eran contradictorios: un primer artículo del grupo de RQ He (Hua et al., 2002) afirmaba que la unión de Tau a ADN es independiente del estado de fosforilación de la proteína, mientras que el artículo más reciente (Lu et al., 2013) demuestra que la hiperfosforilación de Tau en el núcleo disocia a la proteína del ADN.

Nuestros resultados *in vitro* están de acuerdo con otros experimentos *in vivo* desarrollados por el grupo del doctor Jesús Ávila (Camero et al., en revisión). En ensayos de inmunofluorescencia comprobaron que la proteína Tau es fosforilada en condiciones fisiológicas desde el inicio de la división celular, en paralelo con la condensación de la cromatina en células HEK sanas. La proteína fosforilada en ciertos residuos no colocalizó con ADN, de modo que la fosforilación de Tau podría ser necesaria para soltarse, permitiendo la fusión y posterior replicación de ADN en células no neuronales. La inhibición de la unión Tau-ADN mediante fosforilación es un caso análogo al que ocurre en su unión a microtúbulos. Se ha demostrado que la unión de Tau a microtúbulos disminuye a medida que progresa la mitosis como

consecuencia de un aumento de la fosforilación de Tau, lo que a su vez permite el desensamblaje de los microtúbulos a lo largo del ciclo celular (Illenberger et al., 1998).

Por otra parte, debemos reparar en el hecho de que la proteína Tau contiene 85 sitios fosforilables (Hernández et al., 2010) una circunstancia que no puede ser casual. Esto significa que el número de posibles formas fosforiladas de Tau asciende a 2^{85} (aproximadamente $4 \cdot 10^{25}$), una cantidad descomunal que excede no sólo el número de moléculas presentes en una neurona, sino en el cerebro entero. Por tanto, de todas esas posibles formas probablemente ni siquiera la mitad existan *in vivo*, lo que invita a pensar que no hay una función específica detrás de cada sitio fosforilado. En este escenario, la fosforilación podría formar parte de un mecanismo sutil y gradual de regulación en el que la hidrofobicidad de la molécula condicione su localización en la célula. De hecho, un estudio reciente de dinámica molecular (Polyansky & Zagrovic 2012) concluye que la fosforilación de varias proteínas induce cambios en las propiedades electrostáticas que definen la hidrofobicidad de su superficie, lo que a su vez influye en la forma en que las proteínas interactúan con sus alrededores. La proteína Tau es conocida por su capacidad de interactuar con un gran número de moléculas (Mandelkow et al. 2012) incluyendo moléculas de ADN y ARN, a las que protege directa o indirectamente según una publicación reciente (Violet et al., 2014). Por tanto, dado que Tau debe viajar a distintos compartimentos de la célula a causa de su carácter multifuncional, el amplio rango de fosforilación que presenta debe estar destinado a modular de forma fina la hidrofobicidad de su superficie, como medio para controlar su localización e interacción con otras moléculas. La hiperfosforilación de Tau en estados patológicos alteraría esta delicada regulación, impidiendo además su función protectora en situaciones de estrés y contribuyendo a la muerte neuronal.

Es importante relacionar los 2 efectos observados: la fosforilación de Tau y la unión reversible a ADN. En la célula, la concentración de ADN no sufre apenas cambios, sin embargo, la disponibilidad de Tau no fosforilado puede verse alterada en respuesta a múltiples situaciones. Por tanto, sugerimos que la concentración de Tau con un bajo nivel de fosforilación sería el factor limitante que dirige el equilibrio de asociación/disociación del complejo Tau-ADN *in vivo*.

4.1.3 La hidrofobicidad determina la interacción de Tau con otras moléculas

Monitorizando el equilibrio de la unión Tau-ADN a distintas temperaturas y aplicando la ecuación de Van't Hoff, hemos estimado las variaciones de entalpía, energía libre y entropía para la unión de Tau a ADN. No tenemos constancia de que estas magnitudes, dadas a conocer por primera vez en la presente tesis doctoral, hayan sido publicadas con anterioridad en la literatura científica. El incremento de entalpía obtenido a partir de la representación de Van't Hoff en el intervalo de temperaturas estudiado es prácticamente nulo, lo que significa que la influencia de la temperatura en la constante de equilibrio es muy pequeña. Dado que la energía libre de la reacción de formación del complejo es negativa y la entalpía es casi cero, debe tener lugar un aumento de entropía como resultado de la unión de Tau al ADN. El aumento de entropía obtenido experimentalmente es pequeño pero significativo si tenemos en cuenta que la inmovilización de Tau sobre ADN debe suponer un descenso enorme de niveles de energía disponibles que se compensa de algún modo para dar un incremento neto positivo. La liberación de moléculas de agua podría estar detrás de este aumento de entropía.

De hecho, la hidrofobicidad también media la unión de Tau a microtúbulos y existen varios trabajos que confirman la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la formación de este complejo (Goode et al., 2000; Mukrasch et al., 2009). Además, el dominio de unión a microtúbulos (MTBD) está involucrado tanto en la unión de Tau a ADN como en el propio proceso de agregación (Alonso et al., 2001; Wei et al., 2008) lo que implica que Tau no puede estar unido a ellos al agregar. Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en las interacciones Tau-Tau que preceden a la formación de filamentos helicoidales apareados (PHF), los agregados fibrosos de gran tamaño presentes en enfermos de Alzheimer (Jeganathan et al., 2008; Andronesi et al., 2008). Además, se ha comprobado que la polimerización de Tau es un proceso favorecido a elevada temperatura, como consecuencia de la liberación de moléculas de agua que en disolución se encuentran unidas a Tau (Friedhoff et al., 1998). La proteína presenta un bajo contenido en aminoácidos hidrofóbicos, lo que en parte puede explicar su estructura desordenada y desplegada en disolución (Jeganathan et al., 2008). Sin embargo, Tau también presenta un núcleo en el dominio K19 con varios aminoácidos hidrofóbicos que pueden aportar estabilidad a los PHFs.

4.1.4 Los complejos Tau-ADN e histona-ADN comparten propiedades similares

Los resultados obtenidos en los perfiles de absorción ultravioleta demuestran que la proteína Tau no altera la temperatura de fusión del ADN, pero en cambio, afecta a otros parámetros termodinámicos como la entalpía de fusión y la cooperatividad del proceso. Otros autores (Hua & He, 2003) comunicaron previamente un aumento en el punto de fusión del ADN en presencia de Tau a pH 8 y fuerza iónica 10 mM. No obstante, es bien conocido que a pH elevado (baja concentración de protones) y a baja fuerza iónica, se altera la estructura del ADN, lo que les permite alcanzar el punto de fusión a baja temperatura. Estas condiciones de trabajo se alejan de las que utilizamos en nuestros ensayos de fusión, a pH 7 y fuerza iónica próxima a 100 mM, y a su vez, de los parámetros fisiológicos. Por otra parte, el hecho de que hayamos obtenido resultados similares en la fusión del ADN y en la de oligonucleótidos aporta solidez a nuestras conclusiones. Los puntos de fusión de estos pequeños fragmentos de ADN se sitúan alrededor de los 60°C, y por tanto, permiten ver cambios en las curvas de fusión a bajas temperaturas sin necesidad de alterar el pH o la fuerza iónica.

Según la expresión definida en nuestro modelo es factible ver una disminución en la entalpía de fusión en presencia de Tau aunque se mantenga constante el punto de fusión, ya que va acompañada de una disminución en la sigmoicidad de las curvas, y la entalpía es proporcional al cociente entre ambas magnitudes ($\Delta H^0 = RT_m^2/\Delta T$). A diferencia de otros estudios teóricos que calculan la entalpía de fusión a temperatura fisiológica, nuestro modelo no puede obtener valores fiables en dicho intervalo ya que sólo es aplicable cuando existe un equilibrio entre pares de bases abiertos y cerrados, y la fusión de la hélice comienza a 50°C. En cualquier caso, la información más interesante del ensayo viene dada por la sigmoicidad de la curva, que depende del ΔT .

La disminución del parámetro ΔT que observamos en presencia de Tau, también se repitió en los ensayos de fusión del complejo ADN-histona, y puede ser interpretada a la luz del modelo de cremallera como un aumento en la probabilidad de abrir la doble hélice en puntos aislados de la misma. Por ello, tanto la proteína Tau como las histonas reducirían la rigidez de la doble hélice. Este efecto podría ser

beneficioso *in vivo*, ya que ofrece la posibilidad de separar las cadenas de ADN de forma puntual en secuencias aisladas, permitiendo la transcripción de genes no relacionados en función de las necesidades de la célula. Por otra parte, las semejanzas entre Tau e histonas van más allá de los parámetros termodinámicos. Las micrografías electrónicas confirman que el ADN bacteriano, carente de histonas, se organiza con oligómeros de Tau formando una especie de collar, como el complejo ADN-histona. Este resultado está además respaldado por publicaciones anteriores (Qu et al., 2004; Wei et al., 2008). Mediante los ensayos en gel de agarosa comprobamos que el ADN sufre un retardo similar en presencia de Tau e histonas, y lo que es más importante, estos retardos demostraron que la unión de Tau a ADN es independiente de secuencia, lo cual es consistente con las observaciones de otros autores (Villasante et al., 1981) y refuerza la idea de Tau como protector de cualquier secuencia de ADN.

4.1.5 El surco menor no es el único elemento del ADN que interacciona con Tau

La interacción Tau-ADN ha recibido una atención creciente por parte de la comunidad científica en los últimos años y a día de hoy son varios los autores que han demostrado que la proteína Tau, comúnmente asociada a microtúbulos, también puede encontrarse en el núcleo de células neuronales y no neuronales ejerciendo de manera natural una función protectora del genoma (Sjöberg et al., 2006; Rossi et al., 2008; Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014). Por tanto, son varias las evidencias que apuntan a una unión funcional entre Tau y ADN, aunque no podemos descartar que la agregación u otras modificaciones anómalas de la proteína contribuyan de algún modo al inicio o la progresión de patologías neurológicas como la enfermedad de Alzheimer. Nuestros ensayos *in vitro* de resonancia de plasmón superficial en los que estudiamos la interacción Tau-ADN en presencia y ausencia de distamicina A arrojan luz en un tema que ha resultado ser controvertido. Por una parte, hay un artículo que afirma que Tau sólo puede unirse a ADN de cadena doble (Hua et al., 2003), basándose en experimentos cualitativos de retardo en gel donde las relaciones en masa de proteína y ácido nucleico pueden influir en la visibilidad del efecto. Por otro lado, existe una publicación posterior que se opone a la anterior, concluyendo que Tau puede unirse *in vitro* tanto a oligonucleótidos de cadena doble como simple (Krylova et al., 2005).

Estos resultados coinciden con las conclusiones que extraemos de los ensayos de RPS, donde constatamos que Tau se une en tiempo real a oligonucleótidos de hebra simple, y esta unión no es bloqueada por distamicina A, una molécula que compite por el surco menor del ADN. Los autores del trabajo original publicaron un nuevo artículo en el que concluyen que Tau se une específicamente al surco menor del ADN (Wei et al., 2008). En nuestros resultados, en cambio, la distamicina A sólo inhibió parcialmente la unión de Tau al ADN de timo de ternera de cadena doble, indicando de nuevo que aunque Tau puede unirse a la doble hélice del ADN a través del surco menor, existen zonas adicionales en el ADN que sirven como puntos de anclaje para la proteína. Resultados similares se han descrito también *in vivo* con otra serie de moléculas competidoras (Sultan et al., 2011).

La hebra simple de ADN, que en nuestros modelos de interacción es una secuencia aleatoria de 20 nucleótidos, debe de adoptar una forma desordenada en disolución ya que no es lo suficientemente estable como para adquirir una estructura helicoidal, y por tanto, carece de toda clase de surcos. Cuando hibridamos dos cadenas de 20 nucleótidos en la superficie del sensor, es de esperar que las bases nitrogenadas no queden expuestas en disolución y que por tanto, la proteína Tau no pueda acceder a ellas. Aun así, pudimos comprobar que la proteína se puede unir a esta superficie. Esto nos lleva a plantear como hipótesis que los grupos fosfato presentes en todas las secuencias de ADN independientemente de la estructura que tengan, pueden atraer a la proteína Tau a través de interacciones electrostáticas con los aminoácidos de carácter básico (lisina, arginina o histidina), que a pH fisiológico están cargados positivamente. De ser así, no estaríamos ante una interacción determinada únicamente por la secuencia de bases del ADN, como se ha propuesto inicialmente en estudios previos, sino más bien ante una interacción con un carácter genérico. Sabemos que el reconocimiento específico entre el ADN y otras proteínas, entre ellas los factores de transcripción, ocurre en el surco mayor de la doble hélice, ya que éste ofrece un mayor número de bases accesibles y permite la formación de un gran número de enlaces de hidrógeno entre aminoácidos y bases (Rohs et al., 2010). En cambio, Tau se une al surco menor y tiene menor acceso a las bases, lo que ayudaría a proteger cualquier tipo de secuencia en situaciones de estrés celular.

4.2 Interacción A β -ADN: una anomalía en el núcleo celular

4.2.1 Los oligómeros y agregados de A β_{25-35} y A β_{1-40} interaccionan con ADN, a diferencia de otros agregados de origen proteínico

Los péptidos β -amiloides resultan de la ruptura de la proteína precursora de amiloide (APP) y su papel en la célula aún está por aclarar. Lo que sí se conoce en detalle es la extraordinaria tendencia que tienen a agregar, adquiriendo estructuras de láminas β (Zussy et al., 2011; Stroud et al., 2012). La conversión de proteínas y polipéptidos solubles en fibras insolubles de amiloide con un porcentaje mayoritario de estructura β , se ha observado en múltiples patologías (Sipe & Cohen, 2000; Jiménez, 2010; Liu & Zhang, 2011) lo que ha extendido la creencia generalizada de que agregación y lámina β están intrínsecamente asociadas a efectos tóxicos en la célula. En los ensayos de unión de ADN con proteínas envejecidas comprobamos que, de hecho, la interacción de los agregados amiloides con ADN supone un caso único entre todos los demás tipos de agregados. Este resultado sugiere que aunque pudieran formarse agregados anómalos de proteína en el núcleo, no interaccionarían con ADN, a excepción de los agregados amiloides. Podría decirse que los agregados de A β_{25-35} y A β_{1-40} presentan propiedades específicas no compartidas por el resto de agregados estudiados. Entre estas propiedades, la carga neta de los péptidos no parece tener un papel crucial en su interacción con ADN, ya que A β_{25-35} en su forma agregada es un polication y A β_{1-40} un polianión. Además, en un trabajo previo de nuestro laboratorio también se describió la interacción entre ADN y A β_{1-42} , el péptido completo que tiene la misma densidad de carga negativa que A β_{1-40} (Barrantes et al., 2007), lo que confirma que las cargas negativas de los fosfatos del ADN no impiden la unión con polianiones.

Es posible que las propiedades únicas que buscamos procedan de una estructura única: una secuencia de aminoácidos con importante carácter hidrofóbico y una gran propensión a la agregación. Habría sido de gran interés establecer un nexo claro entre la estructura secundaria de los agregados y su interacción con ADN. Aunque conseguimos registrar el espectro infrarrojo de A β_{25-35} , no llegamos a hacer un

seguimiento de la estructura secundaria de todos los agregados envejecidos, pues en el momento en que llevamos a cabo los ensayos de secuestro aún no habíamos logrado poner a punto la espectroscopía FTIR. No obstante, sí que pudimos registrar el espectro de las histonas y comprobamos que su estructura secundaria presenta un porcentaje inferior de lámina β al que muestran los péptidos amiloides.

Los oligómeros de amiloide parecen tener las dimensiones adecuadas para alojarse en el interior de la doble hélice del ADN (Arimon et al., 2005), aunque también se ha descrito su interacción con otros ácidos nucleicos. De hecho, en análisis *post-mortem* de cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer se han hallado muestras de varios tipos de ARN en las placas de amiloide (Ginsberg et al., 1997, 1998), con la presencia mayoritaria del ARN mensajero de proteínas implicadas en la enfermedad (Ginsberg et al., 1999). Es más, trabajos recientes han coincidido en señalar que el perfil de expresión génica en pacientes con Alzheimer está alterado respecto a los individuos sanos (Twine et al., 2011; Parra-Damas 2014). Las últimas hipótesis sostienen que una disminución en los niveles de expresión génica en neuronas está directamente relacionada con el declive cognitivo en etapas tempranas de la enfermedad. A la vista de estos hallazgos, la interacción ADN-amiloide adquiere una relevancia especial, ya que la unión al ADN o al ARN de los péptidos $A\beta$ en cualquiera de sus formas podría alterar los mecanismos transcripcionales.

Estudios en modelos transgénicos de ratón demuestran que el deterioro neuronal comienza antes de que se formen placas de amiloide, en paralelo con la acumulación de $A\beta$ intraneuronal (Oddo et al., 2003; Billings et al., 2005). En el marco de estos modelos hay que apostar por un cambio de paradigma, buscando futuros fármacos que se dirijan no tanto a eliminar las placas de amiloide ya formadas sino a prevenir la formación de las mismas. Se ha sugerido que los oligómeros de amiloide podrían difundir al interior del núcleo neuronal y se ha comprobado que la propia interacción de amiloide con ADN sería suficiente para inducir muerte neuronal a través de la activación de genes implicados en apoptosis (Ohyagi et al., 2005). Por tanto, la búsqueda de moléculas que puedan inhibir estas interacciones aberrantes debe formar parte de los tratamientos encaminados a prevenir o curar la enfermedad de Alzheimer.

4.2.2 La interacción de $A\beta_{25-35}$ con secuencias cortas de ADN es inhibida parcialmente por moléculas con estructura análoga a las bases del ADN

Uno de los aspectos que no habíamos tratado en los primeros estudios de interacción entre ADN y $A\beta$ es el efecto del tamaño de los amiloides en la interacción. Dada la excesiva tendencia del péptido $A\beta_{25-35}$ a formar fibras en cuestión de horas, nos resultó difícil encontrar un método que nos permitiera aislar de forma rápida y eficaz oligómeros de un tamaño intermedio. Inicialmente utilizamos filtros para separar las disoluciones de amiloide en función de su peso molecular, aunque acabamos abandonando este método al perder una gran cantidad de muestra durante el filtrado. La sonicación en cambio, minimizó las pérdidas y nos permitió trocear las fibras de $A\beta_{25-35}$ en pequeños agregados con tamaños que podrían aproximarse más a los que se encuentran *in vivo* en las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer. Curiosamente, las muestras sonicadas siempre mostraron una interacción total y constante con ADN en los ensayos de secuestro, a diferencia de los agregados de $A\beta_{25-35}$ que dejamos evolucionar a temperatura ambiente. El comportamiento de las muestras no sonicadas fue variable y después de hacer un estudio sistemático pudimos constatar que los péptidos recién disueltos interaccionaban con ADN de forma similar a los sonicados, pero con el paso del tiempo la interacción iba reduciéndose hasta que dejaba de ser significativa. Este patrón de interacción va unido a un aumento de tamaño de los amiloides según pudimos comprobar por microscopía electrónica, lo cual sugiere que las formas intermedias o menos agregadas de $A\beta_{25-35}$ son las que interaccionan con ADN de forma más intensa.

Por otra parte, los resultados obtenidos nos hacen pensar que la interacción entre ADN y oligómeros sonicados es más selectiva y por ello elegimos estas especies como modelo para los ensayos de inhibición *in vitro*. También pudimos comprobar que la longitud del ADN elegido en los ensayos puede ser determinante a la hora de comprobar un cierto efecto inhibitorio. Las muestras de ADN nucleosómico digeridas en un amplio rango de tamaños adoptan una estructura de madeja que puede llegar a formar complejos masivos con los agregados de amiloide (no así con los agregados de

otras proteínas, como vimos). Al usar oligonucleótidos de secuencias cortas evitamos las interacciones masivas e investigamos la inhibición de interacciones locales.

El número de moléculas a ensayar para inhibir la interacción ADN-amiloide es interminable, así que decidimos empezar por aquellas que ya se han utilizado en modelos animales y han demostrado reducir la toxicidad inducida por el péptido A β_{25-35} . Probenecid es una de las moléculas que ha mostrado un papel protector frente a la toxicidad del péptido A β_{25-35} en el hipocampo de rata (Carrillo-Mora et al., 2010; Colín-González et al., 2013) y en nuestros ensayos *in vitro* ha inhibido mejor que ninguna otra molécula la interacción de oligómeros de A β_{25-35} con ADN de secuencias cortas. Este fármaco se ha utilizado desde los años 50 en el tratamiento de la gota, que se origina por la acumulación de ácido úrico en el plasma sanguíneo (Gutman, 1951). Al presentar un grupo funcional similar al ácido úrico, probenecid compite por la unión a la proteína transportadora de aniones orgánicos que se encuentra en los riñones, inhibiendo la reabsorción del ácido úrico al plasma (Moller, 1965). Además de mostrar escasos efectos secundarios durante años de ensayos clínicos presenta una ventaja adicional, y es que puede atravesar la barrera hematoencefálica interaccionando con transportadores orgánicos (Yokel, 2006) y por tanto, puede llegar a las neuronas.

Por otro lado, AMP también inhibió parcialmente la interacción de A β_{25-35} con oligonucleótidos, aunque su efecto fue más discreto. Además, desconocemos si podría atravesar la barrera hematoencefálica ya que no tenemos constancia de que se haya administrado en ensayos clínicos. En cualquier caso, el hecho de que haya inhibido la interacción sugiere un protocolo a seguir a la hora de buscar inhibidores, ya que moléculas con estructuras análogas tanto al ADN como a los péptidos amiloides podrían tener éxito deteniendo la interacción ADN-A β . La última molécula que dio resultados positivos *in vitro* fue la tetraciclina, que presenta varios anillos aromáticos en su estructura y ha revertido la toxicidad provocada por oligómeros de A β_{25-35} en el gusano *Caenorhabditis elegans* (Diomedea et al., 2010). Podrían llevarse a cabo nuevos ensayos en el futuro con otros antibióticos como azitromicina o doxiciclina, que tuvieron un efecto similar *in vivo*. De hecho, la ingesta de doxiciclina ya ha mostrado efectos beneficiosos en enfermos de Alzheimer (Loeb et al. 2004).

Los ensayos *in vitro* como los secuestros de ADN monitorizados mediante RPS nos aportan información acerca de las interacciones que podrían ocurrir en neuronas. Aunque en la presente tesis doctoral no hemos llegado a estudiar *in vivo* la interacción ADN-A β_{25-35} , nos han guiado estudios previos que consiguieron revertir la toxicidad del amiloide en modelos animales y hemos encontrado una correlación directa con la inhibición de la interacción ADN-A β_{25-35} . Es preciso extender este tipo de estudios al resto de péptidos implicados en la enfermedad de Alzheimer, principalmente A β_{1-40} y A β_{1-42} , puesto que existen discrepancias acerca de la presencia de A β_{25-35} en el cerebro humano, pero considerando que las estructuras de los agregados amiloides comparten características comunes (Gruden et al., 2007), es lícito afirmar que la interacción ADN-amiloide puede contribuir a la muerte neuronal, desencadenando o agravando patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

Las últimas teorías que tratan de explicar el inicio de la enfermedad de Alzheimer coinciden en otorgar un papel central a los péptidos amiloides, situándolos en un escalón previo a la alteración de la proteína Tau en la cascada de eventos que conducen a la muerte neuronal (Götz et al., 2001; King et al., 2006; Hurtado et al., 2010; Seino et al., 2010; Zempel et al., 2010; Jin et al., 2011; Nussbaum et al., 2012; Liao et al., 2014). Se ha demostrado que los péptidos A β_{1-40} y A β_{1-42} pueden interaccionar con la proteína Tau (Guo et al., 2006; Lasagna-Reeves et al., 2010; Nussbaum et al., 2013) y se ha sugerido que la toxicidad de los amiloides está ligada a la activación de la quinasa GSK3 β a través de varias rutas de señalización que pueden provocar la hiperfosforilación de Tau (Busciglio et al., 1995; Townsend et al., 2007; Magdesian et al., 2008; Huang et al., 2010; Hernández et al., 2010). De hecho, merece especial atención una publicación que asegura que la presencia de proteína Tau en neuronas es esencial para que exista neurotoxicidad inducida por β -amiloide (Rapoport et al., 2002). Los autores extrajeron neuronas del hipocampo de ratones que fueron tratados con agregados de A β y encontraron degeneración únicamente en aquellos modelos que expresaban Tau, no así en neuronas de ratones *Knockout* que no expresaban la proteína. Según esta serie de nuevos hallazgos, los péptidos A β y Tau están claramente relacionados y por tanto, es preciso tener en cuenta ambas moléculas para abordar la enfermedad de Alzheimer en toda su complejidad.

La entrada de péptidos A β al núcleo neuronal no ha podido ser asociada a ninguna función fisiológica hasta la fecha y sin embargo, son varios los estudios que relacionan su localización anómala en el núcleo con la expresión de genes que conducen a la muerte neuronal (Ohyagi et al., 2005; Bailey et al., 2011). La interacción de péptidos antimicrobianos con ácidos nucleicos ya ha demostrado toxicidad en bacterias, y de acuerdo con la hipótesis que atribuye una función microbicida a los péptidos β -amiloides (Soscia et al., 2010) cabe la posibilidad de que también puedan ejercer toxicidad en el núcleo neuronal al ser producidos en exceso. En la línea de esta hipótesis proponemos que la interacción A β -ADN podría estar detrás de cambios en la expresión génica, así como de alteraciones en los mecanismos de transcripción y reparación del ADN que contribuirían de algún modo al inicio de la enfermedad de Alzheimer. Además, varios trabajos han demostrado que los péptidos A β pueden inducir la agregación de la proteína Tau (Rank et al., 2002; Pérez et al., 2004). Nuestros ensayos de SPR indican que la agregación de Tau inhibe su interacción reversible con ADN. Por tanto, considerando que Tau ejerce un papel funcional en el núcleo neuronal regulado por un mecanismo sutil de fosforilación que permite su entrada en respuesta a situaciones de estrés, cabe esperar que alteraciones en la fosforilación o el estado de agregación de Tau provocadas, al menos en parte, por la actividad anómala de los péptidos β -amiloides en el núcleo y en el citoplasma de las neuronas, impidan la unión protectora de Tau al ADN y supongan un foco de toxicidad adicional durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

5

Conclusiones

1. La unión de especies no agregadas de proteína Tau a la doble hélice del ADN es reversible y presenta un importante carácter hidrofóbico. Sólo las formas no fosforiladas de la proteína Tau se unieron de forma significativa tanto al ADN como a la mezcla de ADN e histonas. Este hecho sugiere que la fosforilación podría regular *in vivo* la proporción de Tau disponible para unirse al ADN y a nucleosomas neuronales.

2. La proteína Tau no sólo se une al surco menor de la doble hélice del ADN, sino que también interacciona con elementos adicionales, como los grupos fosfato de ADN de cadena doble y de cadena sencilla. Por tanto, la unión de Tau al ADN también puede ocurrir de modo independiente de secuencia.

3. La fusión del ADN en presencia de Tau presenta menor cooperatividad. Según el modelo de cremallera, este hecho, observado también en presencia de histonas, facilitaría la apertura de la doble hélice en puntos aislados, lo que podría afectar la expresión de ciertos genes. En conjunto, nuestros resultados relativos a la interacción Tau-ADN regulada por fosforilación están de acuerdo con publicaciones recientes que atribuyen a la proteína Tau nuclear un papel funcional en neuronas.

4. La formación de grandes agregados moleculares no es imprescindible para que exista interacción con ADN, como prueban los ensayos con oligómeros de A β_{1-40} , ni suficiente, ya que otros agregados envejecidos de origen proteico no interaccionaron con ADN. Los péptidos A β , en todas sus formas, deben de compartir ciertas propiedades únicas que dan lugar a su interacción sistemática con ácidos nucleicos.

5. A β_{25-35} altamente agregado, al que se atribuye un efecto neurotóxico *in vivo*, adquiere principalmente estructuras secundarias de tipo β , con un gran porcentaje de lámina β intermolecular. En cambio, las histonas presentan un porcentaje mayoritario de estructura secundaria desordenada. La unión funcional de las histonas al ADN no está mediada por láminas β , lo que sugiere que esta estructura está ligada a la interacción anómala de varias formas amiloides con ADN.

6. Los oligómeros sonicados de $A\beta_{25-35}$ interaccionan con ADN de un modo más selectivo que las formas masivamente agregadas. La interacción de $A\beta_{25-35}$ sonificado con ADN de secuencias cortas puede inhibirse parcialmente con probenecid, tetraciclina y en menor medida, con AMP. Este resultado establece un vínculo entre la inhibición de la interacción ADN- $A\beta$ y la inhibición de toxicidad *in vivo*, ya que tanto probenecid como tetraciclina han demostrado reducir la neurotoxicidad ejercida por $A\beta_{25-35}$ en modelos animales.

7. Tanto la proteína Tau como los péptidos $A\beta$ han mostrado una gran afinidad por el ADN. Mientras que la interacción Tau-ADN se postula como una interacción neuroprotectora, la interacción $A\beta$ -ADN tendría un carácter aberrante. La alteración de la expresión génica inducida por péptidos $A\beta$ junto con la inhibición de la unión Tau-ADN podrían estar implicadas en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer y por tanto, constituyen importantes dianas terapéuticas en su tratamiento.

6

Conclusions

1. Binding of non-aggregated Tau protein to the DNA double helix is reversible and is governed by an important hydrophobic effect. Only the non-phosphorylated forms of Tau protein bound as much DNA as a DNA-histone mixture in a significant manner. This fact suggests that phosphorylation might regulate *in vivo* the proportion of available Tau to bind neuronal DNA and nucleosomes.

2. Tau protein not only binds to the minor groove of DNA double helix, but also to additional elements like phosphate groups of double- and single-stranded DNA. Therefore, Tau binding to DNA may also occur in a sequence-independent manner.

3. DNA melting in the presence of Tau protein displays lower cooperativity. According to the zipper model, this fact, observed in the presence of histones as well, would facilitate the opening of the DNA double helix in isolated points, what might affect somehow gene expression. Altogether, our results concerning phosphorylation-dependent Tau-DNA interaction are consistent with recent reports, which attribute a functional role in neurons to nuclear Tau protein.

4. Formation of large molecular aggregates is neither essential to interact with DNA, as proved by assays with A β ₁₋₄₀ oligomers, nor sufficient, since different aged proteinaceous aggregates did not interact with DNA. All forms of A β peptides are supposed to share some unique features that enable its particular interactions with nucleic acids.

5. Highly aggregated A β ₂₅₋₃₅ peptide, which has been linked to neurotoxicity *in vivo*, mainly adopts β -structures, showing an increased percentage of intermolecular β -sheet. In contrast, histones display a predominant proportion of disordered secondary structure. The functional histones-DNA binding is not mediated by β -sheet, suggesting that this structure is closely related to the anomalous interaction of multiple A β forms with DNA.

6. Sonicated A β_{25-35} aggregates interact with DNA in a more selective way than massively aggregated forms. The interaction of sonicated A β_{25-35} aggregates with short sequence-DNA was partially inhibited by probenecid, tetracycline and, to a lesser extent, AMP. These results show a link between inhibiting A β -DNA interaction and toxicity inhibition *in vivo*, since probenecid and tetracycline have been proven to reduce the neurotoxicity exerted by A β_{25-35} in animal models.

7. Not only Tau protein but also A β peptides have shown a high affinity for DNA binding. Whereas Tau-DNA interaction has been postulated to be neuroprotective, A β -DNA interaction might have an aberrant nature. Alterations in gene expression induced by A β peptides in addition to the inhibition of Tau-DNA binding might be involved in early stages of Alzheimer's disease, and thus, they could be important therapeutic targets in its treatment.

7

Bibliography

BIBLIOGRAPHY

Ackmann M, Wiech H, Mandelkow E (2000) Nonsaturable binding indicates clustering of tau on the microtubule surface in a paired helical filament-like conformation. *J Biol Chem* 275:30335-30343.

Agwuh KN, MacGowan A (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. *J Antimicrob Chemother* 58(2): 256-65.

Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:298-303.

Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2:783-787.

Alonso AD, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5562-5566.

Alonso AD, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6923-6928.

Alonso R, Pisa D, Marina AI, Morato E, Rábano A, Carrasco L (2014) Fungal infection in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 10.3233/JAD-132681.

Álvarez G, Muñoz-Montañó JR, Satrústegui J, Ávila J, Bogóñez E, Díaz-Nido J (2002) Regulation of tau phosphorylation and protection against β -amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord* 4:153-165.

Al-Shakhshir RH, Regnier FE, White JL, Hem S (1995) Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 13: 41-44.

- Ávila J (2006) Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett* 580:2922-2927
- Andronesi OC, von Bergen M, Biernat J, Seidel K, Griesinger C, Mandelkow E, Baldus M. (2008) Characterization of Alzheimer's-like paired helical filaments from the core domain of tau protein using solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 130:5922-5928.
- Arimon M, Díez-Pérez I, Kogan MJ, Durany N, Giralt E, Sanz F, Fernàndez-Busquets X (2005) Fine structure study of A β 1-42 fibrillogenesis with atomic force microscopy. *FASEB J* 19:1344-1346.
- Austin JC, Jordan T, Spiro TG (1993) Ultraviolet resonance Raman studies of proteins and related model compounds, in: Clark RJH, Hester RE (Eds.) *Biomolecular Spectroscopy* Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 55-127.
- Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK (2011) Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β -peptide interacting domain (A β ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene* 488:13-22.
- Barrantes A, Camero S, García-Lucas A, Navarro PJ, Benítez MJ, Jiménez JS (2012) Alzheimer's disease amyloid peptides interact with DNA, as proved by surface plasmon resonance. *Curr Alzheimer Res* 9:924-934.
- Barrantes A, Rejas MT, Benítez MJ, Jiménez JS (2007) Interaction between Alzheimer's A β ₁₋₄₂ peptide and DNA detected by surface plasmon resonance. *J Alzheimers Dis* 12:345-355.
- Barrantes A, Sotres J, Hernando-Pérez M, Benítez MJ, de Pablo PJ, Baró AM, Ávila J, Jiménez JS (2009) Tau aggregation followed by atomic force microscopy and surface plasmon resonance and single molecule tau-tau interaction probed by atomic force spectroscopy. *J Alzheimers Dis* 18:141-151.
- Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS letters* 336:417-424.

BIBLIOGRAPHY

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:213-227.

Benítez MJ, Jiménez JS (2002) A method of reversible biomolecular immobilization for the surface-plasmon-resonance quantitative analysis of interacting biological macromolecules. *Anal Biochem* 302:161-168.

von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2005) Tau aggregation is driven by a transition from random coil to β -sheet structure. *Biochim Biophys Acta* 1739:158.

Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-163.

Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005) Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45:675-688.

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.

Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB (2003) Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:330-335.

Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238-250

Bückig A, Tikkanen R, Herzog V, Schmitz A (2002) Cytosolic and nuclear aggregation of the amyloid β -peptide following its expression in the endoplasmic reticulum. *Histochem Cell Biol* 118:353-360.

Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yanker BA (1993) Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and non-neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2092-2096.

Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) β -amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14:879-888.

Calderón-Garcidueñas L, Kavanaugh M, Block ML, D'Angiulli A, Delgado-Chávez R, Torres-Jardón R, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Osnaya N, Villarreal-Calderón R, et al. (2012) Neuroinflammation, hyperphosphorylated tau, diffuse amyloid plaques and down-regulation of the cellular prion protein in air pollution exposed children and adults. *J Alzheimers Dis* 28, 93-107.

Camero S, Benítez MJ, Cuadros R, Hernández F, Ávila J, Jiménez JS. Thermodynamics of the interaction between Alzheimer's disease related Tau protein and DNA. *Under review*.

Cameron B, Landreth GE (2010) Inflammation, microglia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37:503-509.

Carrillo-Mora P, Mendez-Cuesta LA, Pérez-De la Cruz V, Fortoul-van der Goes TI, Santamaria A (2010) Protective effect of systemic L-kynurenine and probenecid administration on behavioral and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus. *Behav Brain Res* 210:240-50.

Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27–30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30:7672-7680.

Cherny, D, Hoyer W, Subramaniam V, Jovin TM (2004) Double-stranded DNA stimulates the fibrillation of α -synuclein in vitro and is associated with the mature fibrils: An electron microscopy study. *J Mol Biol* 344:929-938.

Cherny RA, Legg JT, McLean CA, Fairlie DP, Huang X, Atwood CS, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI (1999) Aqueous dissolution of Alzheimer's disease A β amyloid deposits by biometal depletion. *J Biol Chem* 274:23223-28.

Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M (2010) An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med* 12:1-12.

BIBLIOGRAPHY

Clementi ME, Marini S, Coletta M, Orsinia F, Giardina B, Misiti F (2005) A β (31–35) and A β (25–35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: role of the redox state of methionine-35. *FEBS Lett* 579:2913-2918.

Colín-González AL, Santamaría A (2013) Probenecid: an emerging tool for neuroprotection. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12(7):1050-1065.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.

Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425: 717-720.

Diomede L, Cassata G, Fiordaliso F, Salio M, Ami D, Natalello A, Doglia SM, De Luigi A, Salmona M (2010) Tetracycline and its analogues protect *Caenorhabditis elegans* from β amyloid-induced toxicity by targeting oligomers. *Neurobiol Dis* 40:424-431.

Dong A, Huang P, Caughey WS (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29:3303-3308.

Dong A, Prestrelski SJ, Allison SD, Carpenter JF (1995) Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. *J Pharm Sci* 84:415-424.

Dong A, Jones LS, Kerwin BA, Krishnan S, Carpenter JF (2006) Secondary structure adsorbed onto aluminum hydroxide: Infrared spectroscopic analysis of proteins from low solution concentrations. *Anal Biochem* 351:282-289.

Dousseau F, Pézolet M (1990) Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. *Biochemistry* 29:8771-8779.

Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3(10):1141-54.

Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.

Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J* 11:2131-2138.

D'Ursi AM, Armenante MR, Guerrini R, Salvadori S, Sorrentino G, Picone D (2004) Solution structure of amyloid beta peptide (25-35) in different media. *J Med Chem* 47(17):4231-4238.

Erecińska M, Silver IA (1989) ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:2-19.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N et al. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. *JAMA* 278:1349-1356.

Friedhoff P, Schneider A, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* 37:10223-10230.

Frozza RL, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran RA, Salbego CG (2009) A comparative study of β -amyloid peptides A β 1-42 and A β 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res* 34:295-303.

Georgiou CD, Papapostolou I, Grintzalis K (2009) Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). *Nat. Protoc* 4:125-131.

Ginsberg SD, Crino PB, Hemby SE, Weingarten JA, Lee VM-Y, Eberwine JH, Trojanowski JQ (1999) Predominance of neuronal mRNAs in individual Alzheimer's disease senile plaques. *Ann Neurol* 45:174-181.

Ginsberg SD, Crino PB, Lee VM-Y, Eberwine JH, Trojanowski JQ (1997) Sequestration of RNA in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaques. *Ann Neurol* 41:200-209.

BIBLIOGRAPHY

Ginsberg SD, Galvin JE, Chiu T-S, Lee VM-Y, Masliah E, Trojanowski JQ (1998) RNA sequestration to pathological lesions of neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 96:487.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349(6311):704-706.

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequence and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.

Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 9:4225-4230.

Goode BL, Chau M, Denis PE, Feinstein SC (2000) Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J Biol Chem* 275:38182-38189.

Gómez-Ramos A, Abad X, Lopez Fanarraga M, Bhat R, Zabala JC, Ávila J (2004) Expression of an altered form of tau in Sf9 insect cells results in the assembly of polymers resembling Alzheimer's paired helical filaments. *Brain Res* 1007:57-64.

Gong CX, Liu F, Wu G, Rossie S, Wegiel J, Li L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2004) Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *J Neurochem* 88, 298-310.

Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 65:732-738.

Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61:921-927.

Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293:1491-1495.

Gravina SA, Ho L, Eckman CB, Long KE, Otvos L, Younkin LH, Suzuki N, Younkin SG (1995) Amyloid β protein ($A\beta$) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at $A\beta$ 40 or $A\beta$ 42(43). *J Biol Chem* 270:7013-7016.

Gruden MA, Davidova TB, Malisauskas M, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Wilhelm K, Elistratova EI, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA (2007) Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: Autoantibodies to Abeta₍₂₅₋₃₅₎ oligomers, S100b and neurotransmitters. *J Neuroimmunol* 186:181-192.

Guo JP, Arai T, Miklossy J, McGeer PL (2006) Abeta and tau form soluble complexes that may promote self-aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1953-8.

Gutman AB (1951) Some recent advances in the study of uric acid metabolism and gout. *Bull NY Acad Med* 27:144-164.

Haass C, Schlossmacher M, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski B, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow D, Selkoe DJ (1992) Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322-325.

Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung KY, Saxton MJ, Seereeram A, Reynolds CH, Ward MA, Anderton BH (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* 282:23645-23654.

Hansen JC, Lu X, Ross ED, Woody RW (2006) Intrinsic protein disorder, amino acid composition, and histone terminal domains. *J Biol Chem* 281:1853-1856.

Hao N, Budnik BA, Gunawardena J, O'Shea EK (2013) Tunable signal processing through modular control of transcription factor translocation. *Science* 339(6118), 460-464.

BIBLIOGRAPHY

Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.

Hegde ML, Anitha S, Latha KS, Mustak MS, Stein R, Ravid R, Rao KSJ (2004) First evidence for helical transitions in supercoiled DNA by amyloid β peptide (1-42) and aluminum: a new insight in understanding Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 22:19-31.

Henzler Wildman KA, Lee DK, Ramamoorthy A (2003) Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 42:6545-6558.

Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Ávila J (2010) GSK3: a possible link between β -amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol* 223:322-325.

Holmes BB, Diamond MI (2012) Cellular mechanisms of protein aggregate propagation. *Curr Opin Neurol* 25(6):721-726.

Hua Q, He RQ (2002) Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept Lett* 9:349-357.

Hua Q, He RQ (2003) Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim Biophys Acta* 1645:205-211.

Hua Q, He RQ, Haque N, Qu MH, Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2003) Microtubule associated protein tau binds to double stranded but not single-stranded DNA *Cell Mol Life Sci* 60:413-421.

Huang J, Chen YJ, Bian WH, Yu J, Zhao YW, Liu XY (2010) Unilateral amyloid- β 25-35 injection into the rat amygdala increases the expressions of aberrant τ phosphorylation kinases *Chinese Medical Journal* 123(10):1311-1314.

Hurtado DE, Molina-Porcel L, Iba M, Aboagye AK, Paul SM, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2010) Abeta accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model. *Am J Pathol* 177:1977-1988.

Illenberger S, Zheng-Fischhöfer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* 9: 1495-1512.

Jeganathan S, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E (2008) The natively unfolded character of Tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry* 47(40):10526-10539.

Jiang W, Han Y, Zhou R, Zhang L, Liu C (2007) DNA is a template for accelerating the aggregation of copper, zinc superoxide dismutase. *Biochemistry* 46:5911-5923.

Jiménez JS (2010) Protein-DNA interaction at the origin of neurological diseases: A hypothesis. *J Alzheimers Dis* 22:375-391.

Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ (2011) Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:5819-24.

Johnstone EM, Bebbey LE, Stephenson D, Paul DC, Santerre RF, Clemens JA, Williams DC, Little SP (1996) Nuclear and cytoplasmic localization of the β -amyloid peptide (1-43) in transfected 293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 220:710-718.

Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (2007) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32:577-595.

Kaneko I, Morimoto K, Kubo T (2001) Drastic Neuronal loss in vivo by β -amyloid racemized at Ser²⁶ residue: conversion of non-toxic [D-Ser²⁶] β -amyloid 1-40 to toxic and proteinase-resistant fragments. *Neuroscience* 104:1003-1011.

Kegel KB, Meloni AR, Yi Y, Kim YJ, Doyle E, Cuiffo BG, Sapp E, Wang Y, Qin Z, Chen JD et al. (2002) Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem* 277:7466-7476.

Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1992) Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 59:750-753.

Khurana R, Fink AL (2000) Do parallel beta-helix proteins have a unique fourier transform infrared spectrum? *Biophys J* 78:994-1000.

King ME, Kan H-M, Baas PW, Erisir A, Glabe CG, Bloom GS (2006) Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar β -amyloid. *J Cell Biol* 175:541-6.

Kong J, Yu S (2007) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39:549-559.

Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-1397.

Krylova SM, Musheev M, Nutiu R, Li Y, Lee G, Krylov SN (2005) Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically – the proof obtained in vitro with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *FEBS Lett* 579:1371-1375.

Kubo T, Nishimura S, Kumagai Y, Kaneko I (2002) In vivo conversion of racemized beta amyloid ([D-Ser 26]A β 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A β 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J Neurosci Res* 70:474-483.

Kubo T, Kumagai Y, Miller CA, Kaneko I (2003) Beta-amyloid racemized at the Ser²⁶ residue in the brains of patients with Alzheimer disease: implications in the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:248-259.

Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Guerrero-Muñoz MJ, Jackson GR, Kayed R (2010) Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry* 49:10039-41.

Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111:3167-3177.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL et al. (1995) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269 (5226): 970-973.

Liao D, Miller EC, Teravskis PJ (2014) Tau acts as a mediator for Alzheimer's disease-related synaptic deficits. *Eur J Neurosci* 39:1202-1213.

Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.

Lindwall G, Cole RD (1984) The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J Biol Chem* 259:12241-12245.

Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22:1942-1950.

Liu R, Wang JZ (2009) Protein phosphatase 2A in Alzheimer's disease. *Pathophysiology* 16:273-277.

Liu C, Zhang Y (2011) Nucleic acid-mediated protein aggregation and assembly. *Adv Protein Chem Struct Biol* 84:1-40.

Loeb MB, Molloy DW, Smieja M, Standish T, Goldsmith CH, Mahony J, Smith S, Borrie M, Decoteau E, Davidson W et al. (2004) A randomized, controlled trial of doxycycline and rifampin for patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 52(3):381-387.

Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI (1990) Identification of nuclear τ isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8422-8426.

Lu Q, Soria JP, Wood JG (1993) p44mpk MAP kinase induces Alzheimer type alterations in tau function and in primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 35:439-444.

Lu Y, He HJ, Zhou J, Miao JY, Lu J, He YJ, Pan R, Wei Y, Liu Y, He RQ (2013) Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection. *J Alzheimers Dis* 37:551-563.

BIBLIOGRAPHY

- Lukiw WJ, Cui JG, Yuan LY, Bhattacharjee PS, Corkern M, Clement C, Kammerman EM, BallMJ, Zhao Y, Hill JM (2010) Acyclovir or Abeta42 peptides attenuate HSV-1-induced miRNA-146a levels in human primary brain cells. *Neuroreport* 21:922-927.
- Lukong KE, Chang KW, Khandjian EW, Richard S (2008) RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet* 24:416-425.
- Macedo B, Millen TA, Braga CA, Gomes MP, Ferreira PS, Kraineva J, Winter R, Silva JL, Cordeiro Y (2012) Nonspecific prion protein-nucleic acid interactions lead to different aggregates and cytotoxic species. *Biochemistry* 51:5402-5413.
- Maddalena AS (2004) Cerebrospinal fluid profile of amyloid beta peptides in patients with Alzheimer's disease determined by protein biochip technology. *Neurodegener Dis* 1:231-235.
- Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST (2008) Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 283:9359-9368.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5644-5651.
- Maloney B, Lahiri DK (2011) The Alzheimer's amyloid β -peptide ($A\beta$) binds a specific DNA $A\beta$ -interacting domain ($A\beta$ ID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: Characterizing a new regulatory motif. *Gene* 488:1-12.
- Mandelkow EM, Mandelkow E (2012) Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a006247.
- Marchand C, Krajewski K, Lee HF, Antony S, Johnson AA, Amin R, Roller P, Kvaratskhelia M, Pommier Y (2006) Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites. *Nucleic Acids Res* 34:5157-5165.

Mawanda F, Wallace R (2013) Can infections cause Alzheimer's disease? *Epidemiol Rev* 35:161-180.

Mikhonin AV, Myshakina NS, Bykov SV, Asher SA (2005) UV resonance Raman determination of polyproline II, extended 2.51-helix, and β -sheet psi angle energy landscape in poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid. *J Am Chem Soc* 127:7712-7720.

Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A (2010) Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25–35. *Curr Protein Pept Sci* 11:54-67.

Moller JV (1965) The tubular site of urate transport in the rabbit kidney, and the effect of probenecid on urate secretion. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 23:329-336.

Moreira PI, Zhu X, Wang X, Lee HG, Nunomura A, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2010) Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1802:212-220.

Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jegannathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009) Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol* 7:e34.

Munishkina LA, Fink AL, Uversky VN (2004) Conformational prerequisites for formation of amyloid fibrils from histones. *J Mol Biol* 342:1305-1324.

Nag S, Sarkar B, Bandyopadhyay A, Sahoo B, Sreenivasan VKA, Kombrabail M, Muralidharan C, Maiti S (2011) Nature of the amyloid- β monomer and the monomer-oligomer equilibrium. *J Biol Chem* 286:13827-13833.

Nandi PK (1997) Interaction of prion peptide HuPrp 106–126 with nucleic acid. *Arch Virol* 142:2537-2545.

Neugebauer U, Schmid U, Baumann K, Ziebuhr W, Kozitskaya S, Deckert V, Schmitt M, Popp J (2007) DNA tertiary structure and changes in DNA supercoiling upon interaction with ethidium bromide and gyrase monitored by UV resonance Raman spectroscopy. *Chem Phys Chem* 8:124-137.

BIBLIOGRAPHY

- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B et al. (2005). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6990-6995.
- Nussbaum JM, Schilling S, Cynis H, Silva A, Swanson E, Wangsanut T, Tayler K, Wiltgen B, Hatami A, Ronicke R. (2012) Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . *Nature* 2012; 485:651-5.
- Nussbaum JM, Seward ME, Bloom GS (2013) Alzheimer disease: a tale of two prions. *Prion* 7:14-19.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Ohya Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H et al. (2005) Intracellular A β 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease *FASEB J* 19:255-257.
- Oladejo SA, Xiong K, Hong ZM, Asher SA, Handen J, Lednev IK (2012) UV resonance Raman investigations of peptide and protein structure dynamics. *Chem Rev* 112:2604-2628.
- Park CB, Kim HS, Kim SC (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 244:253-257.
- Parra-Damas A, Valero J, Chen M, España J, Martín E, Ferrer I, Rodríguez-Álvarez J, Saura CA (2014) Crtc1 activates a transcriptional program deregulated at early Alzheimer's disease-related stages. *J Neurosci* 34(17):5776-5787.
- Pérez M, Cuadros R, Benítez MJ, Jiménez JS (2004) Interaction of Alzheimer's disease amyloid β peptide fragment 25-35 with tau protein, and with a tau peptide containing the microtubule binding domain. *J Alzheimers Dis* 6(5):461-467.

Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993) Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13:1676-1687.

Polyansky AA, Zagrovic B (2012) Protein electrostatic properties predefining the level of surface hydrophobicity change upon phosphorylation. *J Phys Chem Lett* 3(8):973-976.

Pooler AM, Noble W, Hanger DP (2014). A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology* 76:1-8.

Popova LA, Kodali R, Wetzel R, Lednev IK (2010) Structural variations in the cross-beta core of amyloid beta fibrils revealed by deep UV resonance Raman spectroscopy. *J Am Chem Soc* 132:6324-6328.

Qu MH, Li H, Tian R, Nie CL, Liu Y, Han BS, He RQ (2004) Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport* 15:2723-2727.

Rank KB, Pauley AM, Bhattacharya K, Wang Z, Evans DB, Fleck TJ, Johnston JA, Sharma SK (2002) Direct interaction of soluble human recombinant tau protein with A β 1-42 results in tau aggregation and hyperphosphorylation by tau protein kinase II. *FEBS Lett* 514:263-268.

Rauk A (2008) Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton Transactions* 10:1273-1282.

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6364-6369.

Rivest S (2009) Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 9:429-39.

Rohs R, Jin X, West SM, Joshi R, Honig B, Mann RS (2010) Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 79:233-269.

BIBLIOGRAPHY

- Rossi G, Dalprà L, Crosti F, Lissoni S, Sciacca FL, Catania M, Di Fede G, Mangieri M, Giaccone G, Croci D, Tagliavini F (2008) A new function of microtubule-associated protein tau. *Cell cycle* 7:1788-1794.
- Santana S, Recuero M, Bullido MJ, Valdivieso F, Aldudo J (2012) Herpes simplex virus type I induces the accumulation of intracellular β -amyloid in autophagic compartments and the inhibition of the non-amyloidogenic pathway in human neuroblastoma cells. *Neurobiology of Aging* 33(2):430e19-e33.
- Sarroukh R, Cerf E, Derclaye S, Dufrene YF, Goormaghtigh E, Ruysschaert JM, Raussens V (2011) Transformation of amyloid β (1–40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure. *Cell Mol Life Sci* 68:1429-1438.
- Seino Y, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Watanabe M, Takamura A, Yamamoto-Watanabe Y, Kurata T, Abe K, Ikeda M, Westaway D et al., (2010) Amyloid β accelerates phosphorylation of tau and neurofibrillary tangle formation in an amyloid precursor protein and tau double-transgenic mouse model. *J Neurosci Res* 88:3547-54.
- Selen A, Amidon GL, Welling PG (1982) Pharmacokinetics of probenecid following oral doses to human volunteers. *J Pharm Sci* 71:1238-1242.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81(2):741-66.
- Serpell LC (2000) Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly *Biochim Biophys Acta* 1502:16-30.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher MG, Whaley J, Swindlehurst C et al. (1992) Isolation and quantitation of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* 359:325-327.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375 (6534):754-60.

Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B et al. (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258:126-129.

Silva JL, Mauricio L, Lima TR, Foguel D, Cordeiro Y (2008) Intriguing nucleic-acid-binding features of mammalian prion protein. *Trends Biochem Sci* 33:132-140.

Simpson JV, Oshokoya O, Wagner N, Liu J, Ji Ji RD (2011) Pre-processing of ultraviolet resonance Raman spectra *Analyst* 136:1239-1247.

Sipe JD & Cohen AS (2000) Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* 130:88-98.

Sjöberg MK, Hestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119:2025-2034.

Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid β -protein is an antimicrobial peptide *PLoS One* 5:e9505.

Spies PE, Slats D, Sjögren JM, Kremer BP, Verhey FR, Rikkert MG, Verbeek MM (2010) The Cerebrospinal Fluid Amyloid β 42/40 Ratio in the Differentiation of Alzheimer's Disease from Non-Alzheimer's Dementia. *Curr Alzheimer Res* 7(5):470-476.

Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance by using radiolabeled proteins. *J Colloid Interface Sci* 143:513-526.

Stroud JC, Liu C, Teng PK, Eisenberg D (2012) Toxic fibrillar oligomers of amyloid- β have cross- β structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 7717-7722.

Su LY, Willner DL, Segall AM (2010) An antimicrobial peptide that targets DNA repair intermediates in vitro inhibits Salmonella growth within murine macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1888-1899.

BIBLIOGRAPHY

Subbalakshmi C, Sitaram N (1998) Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* 160:91-96.

Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, et al. (2011) Nuclear Tau, a key player in Neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 286:4566-4575.

Suram A, Hegde ML, Rao KS (2007) A new evidence for DNA nicking property of amyloid beta- peptide (1-42): relevance to Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 463:245-52.

Tian Q, Wang J (2002) Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11:262-269.

Tibanyenda N, De Bruin SH, Haasnoot CA, van der Marel GA, van Boom JH, Hilbers CW (1984) The effect of single base-pair mismatches on the duplex stability of d(T-A-T-T-A-A-T-A-T-C-A-A-G-T-T-G)·d(C-A-A-C-T-T-G-A-T-A-T-T-A-A-T-A). *Eur J Biochem* 139:19-27.

Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007) Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282:33305-33312.

Twine NA, Janitz K, Wilkins MR, Janitz M (2011) Whole transcriptome sequencing reveals gene expression and splicing differences in brain regions affected by Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 6:e16266.

Villasante A, Corces VG, Manso-Martínez R, Ávila J (1981) Binding of microtubule protein to DNA and chromatin: Possibility of simultaneous linkage of microtubule to nucleic acid and assembly of the microtubule structure. *Nucleic Acids Res* 9: 895-908.

Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, Caillierez R, Talahari S, Nessler F, Lefebvre B, Bonnefoy E, et al. (2014) A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front Cell Neurosci* 8:84.

Vismara G, Simonini F, Onesto E, Bignamini M, Miceli V, Martini L et al. (2009) Androgens inhibit androgen receptor promoter activation in motor neurons. *Neurobiol Dis* 33:395-404.

Vogelsberg-Ragaglia V, Schuck T, Trojanowski JQ, Lee VMY (2001) PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol* 168:402-412.

Wang M, Jiji RD (2011) Resolution of localized small molecule-A β interactions by deep-ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Biophys Chem* 158:96-103.

Wei Y, Qu MH, Wang XS, Chen L, Wang DL, Liu Y, Hua Q, He RQ (2008) Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *Plos ONE* 3:e2600.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1858-1862.

Wozniak MA, Frost AL, Itzhaki RF (2009) Alzheimer's disease-specific tau phosphorylation is induced by herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* 16:341-350.

Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB (2007) Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett* 429:95-100.

Xu L, Shan S, Wang X (2013) Single point mutation alters the microstate dynamics of amyloid β -protein A β 42 as revealed by dihedral dynamics analyses. *J Phys Chem B* 117:6206-6216.

Xu M, Shashilov V, Lednev IK (2007) Probing the cross-beta core structure of amyloid fibrils by hydrogen-deuterium exchange deep ultraviolet resonance Raman spectroscopy *J Am Chem Soc* 129:11002-11003.

Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.

Yokel RA (2006) Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 10:223-53.

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N et al. (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53(3):337-51.

BIBLIOGRAPHY

Zandomenighi G, Krebs MRH, McCammon MG, Fandrich M (2004) FTIR reveals structural differences between native-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci* 13:3314-3321.

Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2010) Abeta oligomers cause localized $\text{Ca}^{(2+)}$ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 30:11938-50.

Zhou XW, Gustafsson JA, Tanila H, Bjorkdahl C, Liu R, Winblad B, Pei JJ (2008) Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A. *Neurobiol Dis* 31:386-394.

Zimm BH, Bragg JK (1959) Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains. *J Chem Phys* 31:526-535.

Zussy C, Brureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G, Naert G, Meunier J, Chevallier N, Maurice T, Givalois L (2011) Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid- β fragment in rats. *Amer J Pathol* 179:315-334.

Published articles during PhD period

- Barrantes A, Camero S, García-Lucas A, Navarro PJ, Benítez MJ, Jiménez JS (2012) Alzheimer's disease amyloid peptides interact with DNA, as proved by surface plasmon resonance. *Current Alzheimer Research* 9:924-934.
- Camero S, Ayuso JM, Barrantes A, Benítez MJ, Jiménez JS (2013) Specific binding of DNA to aggregated forms of Alzheimer's disease amyloid peptides. *International Journal of Biological Macromolecules* 55:201-206.
- Camero S, Benítez MJ, Jiménez JS (2013) Anomalous protein-DNA interactions behind neurological disorders. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 91:37-63.
- Camero S, Benítez MJ, Barrantes A, Ayuso JM, Cuadros R, Ávila J, Jiménez JS (2014) Tau protein provides DNA with thermodynamic and structural features which are similar to those found in histone-DNA complex. *Journal of Alzheimer's Disease* 39:649-660.